



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Evaluación tóxica, genotóxica y citotóxica del fruto de
Morinda citrifolia (NONI) cultivada en el Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Edwin Alfonso ESPINOZA GUTIÉRREZ

Cinthia Farath LETO HUAYANCA

ASESORES

Mg. César Máximo FUERTES RUITÓN

Dr. Jorge Luis ARROYO ACEVEDO

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Espinoza, E & Leto, J. Evaluación tóxica, genotóxica y citotóxica del fruto de *Morinda citrifolia* (NONI) cultivada en el Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2010.

DEDICATORIA

Se agradece al Mg. César Fuertes Ruitón y Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo por su guía e incomparable apoyo en la realización del trabajo de investigación, al Mg. Manuel Marín (*Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raymondi. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Lima, Perú*) y a la empresa Natural Planet por la donación del fruto en el estudio.

Un agradecimiento especial a nuestros padres,
hermanos y amigos que supieron apoyarnos
en los momentos difíciles, nos alentaron
para continuar y no rendirnos ante los
problemas que se presentaron
en nuestro camino.

Agradecemos también a la Srta.

Mercedes Vásquez Bienvenida

por su colaboración y

el apoyo brindado con

sus conocimientos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I.- RESUMEN	7
II.- SUMMARY	8
III.- INTRODUCCIÓN	9
IV.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
V.- GENERALIDADES	12
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS	26
• Material vegetal y preparación de la muestra	26
• Evaluación genotóxica	26
• Toxicidad a dosis repetidas	28
• Evaluación citotóxica	31
• Análisis cromatográfico	36
VII.- RESULTADOS	37
• Evaluación genotóxica	37
• Toxicidad a dosis repetidas	39
• Evaluación citotóxica	63
VIII.- DISCUSIÓN	69
• Evaluación genotóxica	69
• Toxicidad a dosis repetidas	69
• Evaluación citotóxica	71
IX.- CONCLUSIONES	73
X.- RECOMENDACIONES	74
XI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ABREVIATURAS

- Hematocrito..... (Hcto)
- Hemoglobina..... (Hb)
- Leucocitos totales..... (L)
- Colesterol (CT)
- Glucosa..... (Glu)
- Triglicéridos..... (TG)
- Úrea..... (U)
- Glutámico-oxalacético transaminasa..... (TGP)
- Fosfatasa alcalina..... (FA).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la actividad tóxica, genotóxica y citotóxica del fruto de *Morinda citrifolia* (NONI) cultivada en el Perú. Se realizó en el Laboratorio de Farmacología y Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Material y métodos. Se usaron 21 ratas albinas cepa Holtzman hembras, 48 ratones hembras cepa Balb/c y erizos de mar del género *Tetrapygus niger*. La toxicidad a dosis repetidas se realizó en ratas distribuidas al azar en 3 grupos, el primer grupo recibió solución salina fisiológica 5mL/kg, el segundo grupo recibió extracto etanólico a 1000mg/kg y el tercer grupo recibió extracto acuoso a 1000mg/kg, asimismo se evaluó posibles cambios hematológicos, bioquímicos, histopatológicos y variaciones en el peso corporal. La genotoxicidad se realizó en 8 grupos de 6 ratones, buscándose la presencia de micronúcleos en células rojas lo que fue expresado en porcentaje. La citotoxicidad se llevó a cabo en huevos fertilizados de erizos de mar observándose variación e inhibición en los estadios de desarrollo.

Resultados. En ratas se observó disminución del peso corporal en 6% y 7% correspondiente al grupo acuoso y etanólico, y ausencia de variación en los parámetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Se observó la presencia de micronúcleos entre 10% y 23%, para el grupo tratado con el extracto acuoso y etanólico respectivamente, con respecto al control positivo quien afectó un 100% a los animales que recibieron tratamiento ($p < 0,05$). Los dos extractos evaluados inhibieron el desarrollo de los huevos fertilizados de erizos de mar.

Conclusiones. Los extractos del fruto de *Morinda citrifolia* no poseen actividad tóxica, ni genotóxica pero si poseen actividad citotóxica en huevos de erizo de mar.

Palabras clave: *Morinda citrifolia*, toxicidad, genotoxicidad, micronúcleos.

SUMMARY

Objective: Evaluate the toxic activity, genotoxic and cytotoxic fruit of *Morinda citrifolia* (Noni) cultivated in Peru. Was performed at the Laboratory of Pharmacology and Animal house UNMSM School of Medicine. **Material and methods:** were used 21 female Holtzman albino rats, 48 female mice strain BALB/c, sea urchins of the genus *Tetrapygus niger*. According to Mancebo A et al rats were randomized into 3 groups, one received saline 5 mL/kg, the second ethanol extract and the third extract, both at the same concentration of 1000 mg/kg; while that for the assay of dose toxicity repeated for 60 days was assessed possible of hematological, biochemical, histopathological changes and body weight, according Schimd the genotoxicity was carried out in mice grouped into eight groups of six mice per group found the presence of micronucleus in red blood cells which was expressed as a percentage. The cytotoxicity was carried out in fertilized eggs of sea urchins and inhibition is considerable variation in the stages of development. **Results:** In rats was observed decrease of the body weight in 6% y 7% related to water and ethanolic group, and lack of variation in the hematological, biochemical and histological parameters. We observed the presence of micronuclei between 10% and 23% for the aqueous and ethanol extracts respectively, compared to positive controls 100% who love the animals that received treatment ($p < 0.05$). The two substances tested inhibited the development of the fertilized eggs of sea urchins. **Conclusions:** Under experimental conditions the plant has shown that when administered orally for 60 days is safe in mice, is not genotoxic and has cytotoxicity in the eggs of sea urchin.

Key words: *Morinda citrifolia*, toxicity, citotoxicity, genotoxicity, micronucleus.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la medicina tradicional ha tenido un notable auge, porque constituye una alternativa en la salud de la población. En la actualidad el renacimiento de los tratamientos con plantas medicinales, justificada por la comprobación de la efectividad de muchas de ellas, demanda que la aplicación se efectúe sobre una base científica que valide la actividad terapéutica y la relativa inocuidad de estas [1]. En algunos casos los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades tóxicas, mutagénicas [2] y carcinogénicas, y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones, de ahí el peligro potencial que encierra el consumo indiscriminado de plantas medicinales o sus derivados, debido a los escasos datos que existen sobre la acción mutagénica de plantas medicinales consumidas por la población [3].

En la actualidad ningún ensayo por si sólo es capaz de detectar los agentes genotóxicos, por tanto el procedimiento usual es ejecutar una batería estándar de pruebas. Los grupos de trabajo de la Unión Europea (EU), la Organización Económica de Cooperación y Desarrollo (OECD) y, recientemente, la Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) han definido el uso de baterías de ensayos de genotoxicidad [4]. En el ámbito internacional, la evaluación genotóxica de plantas con actividad terapéutica es un requisito de carácter obligatorio [3-5] y, aunque no existe un consenso generalizado sobre los tipos y cantidad de ensayos de genotoxicidad deben realizarse, existen criterios coincidentes para clasificar en genotóxicos o no, los productos derivados, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante dichos ensayos [6].

Por lo anterior expuesto se realizó el estudio de la actividad citotóxica, mediante el Bioensayo de Citotoxicidad en embriones de erizo de mar del extracto etanólico y acuoso de *Morinda citrifolia* obtenido a partir del fruto del Noni, cultivado en nuestro país; este ensayo será la base para un posterior estudio para seleccionar las moléculas con propiedades antineoplásicas potenciales de esta planta, y una evaluación sobre líneas celulares. Así mismo, se realizó el estudio de genotoxicidad y toxicidad del

extracto del fruto de *Morinda citrifolia*, especie originaria de la Polinesia, que se ha adaptado con facilidad al suelo peruano. La realización de un estudio de toxicidad a dosis repetidas por 28 días (1000 mg/kg.), en el cual no se reportaron muertes ni signos tóxicos [11], pero recomiendan estudios por períodos más largos, sirvieron como base del presente estudio en el cual se buscó determinar los signos de toxicidad [12] manifestados por la administración diaria oral por 60 días de la sustancia de ensayo, y la prueba de genotoxicidad mediante el método de inducción de micronúcleos en ratón, ensayo que por primera vez se realiza en esta especie vegetal en nuestro país.

En el presente estudio buscamos demostrar que el fruto de *Morinda citrifolia* (NONI) cultivada en el Perú tiene efecto citotóxico a nivel de las células de los huevos de erizos de mar, no tiene un efecto tóxico en ratas y tampoco efecto genotóxico en ratones. El presente trabajo se dio a través de las siguientes pruebas:

- Toxicidad a dosis repetidas por 60 días en ratas para medir los parámetros hematológicos y bioquímicos, y realizar un estudio histopatológico [1, 11, 12].
- Citotoxicidad mediante el bioensayo en huevos de erizos de mar [46, 47, 51].
- Genotoxicidad mediante el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón [4, 5, 6, 35].

Hipótesis.

- El fruto de *Morinda citrifolia* tiene efecto citotóxico a nivel de las células de los huevos de erizos de mar
- El fruto de *Morinda citrifolia* no tiene efecto tóxico en ratas, ni efecto genotóxico en ratones.

Objetivo general.

- Evaluar la actividad tóxica, genotóxica y citotóxica del fruto de *Morinda citrifolia* cultivada en el Perú.

Objetivos específicos.

- Evaluar la toxicidad a dosis repetidas por 60 días en ratas para medir los parámetros hematológicos y bioquímicos, y realizar un estudio histopatológico.
- Evaluar la citotoxicidad mediante el bioensayo en huevos de erizos de mar.
- Evaluar la genotoxicidad mediante el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón.

GENERALIDADES

La Toxicología se define como la ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar y prevenir el riesgo que representan [13].

Se ofrecen diversos términos tomados de la versión española del Glosario de la IUPAC [13].

Absorción (biológica): proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo; puede tener lugar a través de diferentes vías.

Administración (de una sustancia): aplicación de una cantidad conocida de una sustancia a un organismo por una ruta definida y procedimiento reproducible.

Agudo: exposiciones o efectos a corto plazo. En toxicología experimental, estudios de corta duración, normalmente de 24h, o de dos semanas o menos, iniciados por la administración de una dosis única.

Bioensayo: procedimiento para estimar la concentración o actividad biológica de una sustancia midiendo su efecto sobre un sistema vivo.

Genotoxicología: estudia los efectos de los tóxicos sobre el material genético.

Genotóxicos: agentes físicos o químicos que producen daño en el material genético celular.

Toxicidad: capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetida), tipo y gravedad del daño.

Toxicidad aguda: capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente 24 horas, pero se admite hasta 14 días)

después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis múltiples (o exposiciones múltiples) de 24 horas.

Toxicidad crónica: capacidad de una sustancia para producir efectos adversos consecuentes a una exposición prolongada; estos pueden aparecer durante o después de interrumpida la exposición.

La toxicidad de una sustancia química se refiere a la capacidad de causar daño en un órgano determinado, alterar los procesos bioquímicos o alterar un sistema enzimático. Todas las sustancias, naturales o sintéticas, son tóxicas, es decir que producen efectos adversos para la salud en alguna condición de exposición. Es incorrecto denominar algunas sustancias químicas como tóxicas y otras como no tóxicas. Las sustancias difieren grandemente en su toxicidad. Las condiciones de exposición y la dosis son factores que determinan los efectos tóxicos [14].

Si la dosis de una sustancia es suficientemente alta puede ser peligrosa para cualquier ser vivo, como también si la dosis de una sustancia muy tóxica es muy baja podrá no producir efecto adverso. El período de tiempo en el que se administra una dosis y la frecuencia son informaciones muy importantes. Para que una sustancia química produzca un efecto, ésta debe estar en contacto con el organismo. Las sustancias químicas pueden ingresar al organismo por tres vías principales: digestiva, respiratoria y dérmica. Después del ingreso, por cualquiera de estas vías, las sustancias químicas pueden ser absorbidas y pasar a la sangre, distribuirse por todo el organismo, llegar a determinados órganos donde son biotransformadas, producir efectos tóxicos y posteriormente ser eliminadas del organismo. También una sustancia química puede entrar al organismo por otras vías, como por ejemplo por inyección venosa o intramuscular, pero estas vías no son de gran interés desde el punto de vista toxicológico y especialmente cuando se trata de accidentes producidos por sustancias químicas [14].

Los efectos tóxicos observados pueden ser: daño a los tejidos y otras modificaciones patológicas, lesiones bioquímicas, efectos en la reproducción, mutagenicidad, teratogenicidad, efectos irritantes y reacciones alérgicas. Los tres primeros puntos de contacto entre sustancias químicas presentes en el ambiente y el

organismo son el tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio y la piel. Debe recordarse que las sustancias químicas se absorben y pasan a la sangre, y luego pasan al hígado, riñones, sistema nervioso y sistema reproductivo, entre otros.

En la evaluación toxicológica de nuevas sustancias se emplean baterías de ensayos en diferentes especies animales, que comprenden modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Las mismas abarcan diferentes dianas de toxicidad, que van desde la toxicidad intrínseca de la sustancia evaluada en los ensayos de toxicidad aguda, hasta la evaluación de sus posibles efectos tóxicos en los diferentes sistemas y órganos mediante la conducción de ensayos denominados de toxicología especial, como son los estudios de genotoxicidad, de teratogénesis y carcinogénesis [15-21].

Desde la pasada década, como resultado de los avances científicos y por razones éticas y prácticas, se han introducido cada vez más los denominados métodos alternativos con el objetivo de reducir el número de animales empleados en cada ensayo y refinar procedimientos existentes para disminuir el estrés y el sufrimiento de los mismos [19,22].

El empleo de animales de experimentación en estudios toxicológicos *in vivo* está regido por regulaciones con vistas a un adecuado uso, según los requerimientos del estudio y tomando en cuenta principios éticos [23]. Asimismo, ha de estar respaldado por un protocolo de ensayo, que debe confeccionarse cumpliendo las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en ensayos pre-clínicos y los protocolos específicos del estudio [24].

La selección de los diferentes ensayos toxicológicos a emplear, especies, tiempo y vía de exposición, así como de los niveles de dosis a emplear en los mismos, estarán en dependencia de las características propias de la sustancia a ensayar, así como de los objetivos de su posible uso en humanos [25].

El estudio de la toxicidad aguda evalúa la toxicidad inducida por la droga sujeta a estudio como resultado de la administración de altas dosis, ya sea por la administración única o repetida en un intervalo no mayor de 24 horas [25-26],

brindando información sobre la toxicidad intrínseca del producto y el posible riesgo que conlleva su exposición aguda. Además, aporta valiosa información para la selección de los niveles de dosis a emplear en los estudios subcrónicos [25]. Durante muchos años, la toxicología aguda era sinónimo de búsqueda de la dosis letal media (**DL50**), la cual causa la muerte del 50% de los animales. Este método dejó de ser requisito para el registro de medicamentos a finales del 2002, siendo reemplazado por tres métodos alternativos: Método de la Dosis Fijada, Método de las Clases de Toxicidad Aguda y Método Arriba y Abajo. Los dos primeros son producto de iniciativas europeas, y el tercero es fruto de una iniciativa americana [25]. A partir de entonces, los países que integran la OECD no aceptan los estudios agudos clásicos como parte de la documentación para el registro de medicamentos.

Es suficiente demostrar que las dosis empleadas son lo adecuadamente altas con relación a la dosis mínima con actividad farmacológica en esa especie [21], siendo la letalidad sólo uno de los indicadores de la toxicidad aguda de la sustancia que se evalúa, conjuntamente con los efectos tóxicos observados y su momento de aparición. La letalidad permite establecer la dosis con la cual se observa “toxicidad evidente”, así como definir la curva dosis-efecto [25,26].

La selección de los niveles de dosis ha sufrido variaciones con la introducción de estos nuevos métodos. La dosis de 5g/kg, nivel aceptado durante muchos años como dosis máxima, desde diciembre de 2001 se ha reducido a 2g/kg en el Método de las Clases, el Test Límite y el Método Arriba y Abajo, aunque sigue siendo la dosis máxima de elección en el Método de la Dosis Fijada [25,26].

El tiempo de duración mínima de los estudios de toxicidad de administración continuada se define, dentro de los requisitos para el registro de medicamentos, en función de la duración del tratamiento a emplear en humanos para el producto en cuestión. Sin embargo, en la práctica generalmente se aplican diseños establecidos y armonizados, en los cuales la información de los estudios precedentes constituye la información básica necesaria para el diseño del nuevo estudio, fundamentalmente en cuanto a la selección de la dosis y el refinamiento de las observaciones y

determinaciones sobre órganos diana en particular. De este modo, a los resultados de los estudios de dosis única le sigue la realización de estudios de administración continuada, con diseños subagudos, subcrónicos y crónicos [21].

Los estudios subagudos se definen como los efectos tóxicos que se manifiestan tras la administración repetida de una sustancia durante un corto período de tiempo, generalmente entre 14 y 30 días. Este ensayo tiene como objetivo obtener información para la selección de los niveles de dosis que serán empleados en los estudios subcrónicos y crónicos, así como la identificación de los efectos tóxicos que pudieran aparecer bajo estas condiciones de experimentación [27,28].

La toxicidad subcrónica, se define como los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa, aproximadamente el 10% del tiempo de vida del animal en estudio. Esto propicia la detección de los efectos aditivos debido a la administración del producto, y permite definir la máxima dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con la droga (NOEL), así como la dosis máxima tolerada (DMT). El estudio subcrónico no es capaz de detectar aquellos efectos que se manifiestan tras un mayor período de latencia; sin embargo, brinda una valiosa información sobre los órganos dianas, y constituye la base para la selección de los niveles de dosis a evaluar en los estudios crónicos [27-29].

Los ensayos crónicos se realizan con el objetivo de determinar potencial toxicológico de la sustancia luego de una prolongada y repetida administración. El tiempo de administración varía para especies roedoras y no roedoras. Así, en roedores es entre 6 y 12 meses, y en no roedores de 9 y 12 meses, períodos suficientes como para que se manifieste el efecto tóxico de una sustancia por su uso crónico [27,29]. El ensayo debe ser realizado en al menos dos especies: una roedora, preferiblemente en ratas (al menos 20 animales/sexo/grupo); y una no roedora, siendo los perros (al menos 4 animales/sexo/grupo) una de las más empleadas. El empleo de otras especies en estudios crónicos es poco frecuente, y ha de realizarse teniendo en cuenta argumentos sólidos que demuestren la necesidad del empleo de la misma. Su diseño se encamina a

detectar los efectos tóxicos generales, incluidos los neurológicos, fisiológicos, bioquímicos, conductuales y patológicos, como resultado de la prolongada acción y la incrementada concentración de la sustancia administrada o sus metabolitos. En estos estudios es conveniente poder determinar la relación dosis respuesta; los niveles de dosis a utilizar se seleccionan de acuerdo a toda la información fármaco-toxicológica precedente, y ésta se analiza como un todo durante el diseño experimental, debido a lo costoso que resulta este tipo de ensayo. La máxima dosis a emplear, la cual no debe exceder 1 000mg/kg de peso corporal por día, debe inducir signos de toxicidad sin que ponga en peligro la supervivencia de los animales, para lo cual es necesario basarse en los hallazgos indicativos de toxicidad del estudio subcrónico precedente. Por su parte, la dosis menor no debe inducir evidencias de toxicidad, mientras que en la dosis intermedia se debe manifestar una disminución de los síntomas y signos indicativos de toxicidad observados en la dosis mayor [27-29].

Estudios de citotoxicidad en líneas celulares dentro del tamizaje toxicológico inicial de los productos, también pueden ser incluidos los ensayos *in vitro* que permitan detectar alteraciones de las funciones celulares básicas, debido a la exposición a un compuesto prueba que conlleve un daño celular. Estos ensayos emplean como modelos experimentales microorganismos, células y órganos aislados, cultivos primarios y líneas celulares [30]. Entre las pruebas de citotoxicidad más utilizadas para estos fines se encuentran: el ensayo de captación del rojo neutro, el ensayo de enlazamiento al azul de kenacid, el ensayo de reducción del bromuro de dimetil-difenil-tetrazólico (MTT) y ensayo de huevos fertilizados de erizos de mar.

Estos ensayos utilizan la viabilidad celular como un índice de toxicidad celular. De manera general, se basan en que un compuesto citotóxico debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular, como son: la síntesis del ADN, el funcionamiento de los organelos, la integridad de la membrana celular o la síntesis de las proteínas. Estas afectaciones conllevan a una disminución del crecimiento de las células, lo que puede ser cuantificado emitiendo un criterio de viabilidad celular.

El ensayo en erizo de mar *Tetrapyrgus niger* es muy utilizado en estudios de citotoxicidad ya que es fácil obtener sus gametos y realizar fecundaciones, además las etapas de desarrollo pueden ser identificadas claramente. Los estudios en erizos de mar proporcionan información sobre la fecundación y el desarrollo embrionario, siendo un modelo de desarrollo del embrión. El tamaño de los gametos en erizo es muy similar al de los gametos humanos [56]. Otro aspecto importante a considerar es que el agua de mar debe estar lo mas limpia posible, sería ideal un proceso de filtración, sin embargo lo que se puede realizar es mantener el agua durante un par de días en un recipiente sin moverla para decantar toda la materia en suspensión, luego trasladarla a otro recipiente con mucho cuidado. Es aconsejable también realizar una esterilización del agua, este proceso puede ser sencillo, podrías mantener a "Baño María" un recipiente con el agua de mar, durante 45 minutos a temperatura de 100°C. De esta manera se evita la contaminación del agua durante el desarrollo embrionario.



Figura N°1. Erizos de mar. Los sexos son separados. Los productos genitales son expulsados al exterior, y la fecundación es fuera, el producto genital en las hembras es anaranjado y blanco en los machos.

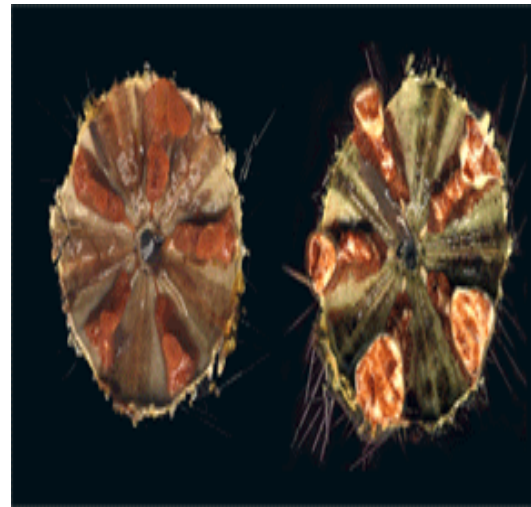


Figura N°2. Los productos genitales proceden de las gónadas. Obedeciendo a la simetría pentaradial de estos animales, los gónadas son 5 y dispuestos de manera irradiada con relación al eje polo oral-polo aboral.

Los Echinoideos (erizos de mar), son todos diocos, es decir tienen sexos separados. Por lo general, existen cinco gónadas dispuestas en el lado interno del caparazón. De cada una parte un conducto denominado gonoducto que se abre por un orificio llamado gonópore localizado en la zona aboral (parte superior del erizo) [56].

Existen diversas técnicas a través de las cuales se pueden obtener los gametos en un organismo vivo. Consisten básicamente en estímulos que se aplican al animal en todo el cuerpo o en sectores localizados con el fin de alterar sus gónadas e inducir la liberación de los gametos. Existen tres métodos empleados: Estímulo Químico, Estímulo Físico y Estímulo Eléctrico [57].

El estímulo químico consiste en la aplicación de un compuesto químico o reactivo en el individuo, el cual actúa directamente sobre las gónadas induciendo la salida de los gametos.

El estímulo físico se basa en la aplicación de un agente físico sobre el individuo como "shocks" térmicos, salinos o estimulación por masajes, como en el caso de los peces.

El estímulo eléctrico consiste en aplicar pequeños golpes de electricidad de bajo voltaje, lo que cambia la polaridad de las membranas de las gónadas, permitiendo con ello la salida de los gametos. Esta técnica es usada generalmente en camarones.

El proceso de la fecundación comienza con la interacción del espermatozoide con el ovocito maduro. La primera interacción consiste en el contacto del espermatozoide con la cubierta más externa del ovocito, esto desencadena una serie de reacciones, entre ellas la reacción del espermatozoide, lo que permite finalmente la incorporación y dispersión del material genético al interior del ovocito. En los erizos la primera interacción de los gametos ocurre en la cubierta de gelatina externa del ovocito. Esta cubierta posee receptores especie-específicos, que interactúan con los receptores de la membrana celular de los espermatozoides, originando la reacción del acrosoma. Con esto se desencadena una serie de eventos que llevan a la fusión de la membrana plasmática del ovocito con la membrana interna del acrosoma. Luego se forma una capa de fecundación, la que evita la poliespermia. Posteriormente el espermatozoide penetra hacia el interior del ovocito para terminar en la fusión de ambos pronúcleos [57].

Luego de la fecundación, la fusión de ambos gametos forma una única célula denominada cigoto, con el cual se recupera el número inicial de cromosomas del individuo. Con esto se da inicio a la segmentación, proceso por el cual, a partir de una

célula única, se suceden una serie de divisiones mitóticas hasta llegar al estado de blástula. La segmentación se inicia con la división del núcleo, quedando la célula huevo dividida en dos células hijas denominadas blastómeros, cada una de la cuales se divide para en total 4 células y de esta manera el aumento de blastómeros crece en forma geométrica. En esta etapa los blastómeros permanecen unidos dando al cigoto el aspecto de una mora (estado de mórula) [58].

Tras cada división los blastómeros son más pequeños. La **Blástula**, el último estado de segmentación, en el cual podemos encontrar 64 blastómeros formando una capa externa de células compactas entre sí (blastodermo) y con una gran cavidad interna (blastocelo) convirtiendo al embrión en una especie de esfera hueca. La siguiente fase es la Gastrulación, en la cual el blastodermo da origen a las capas germinales, el estado resultante se llama gástrula. Posteriormente la **gástrula** pasa a formar la larva, en este caso denominada “**larva pluteus**”. Esta posee boca, ano y tubo digestivo, su forma es cónica y caracterizada por la presencia de 4 brazos o espinas [58].

ESTADOS DE DESARROLLO EN EL ERIZO DE MAR












		
HUEVO FECUNDADO 90-110 min		DOS BLASTOMEROS 2,5 h
		
4 BLASTOMEROS	8 BLASTOMEROS	16 BLASTOMEROS
		
32 BLASTOMEROS	64 BLASTOMEROS	BLASTULA 24 h
		
GASTRULA 48 h	PLUTEUS 3 días	PLUTEUS 5 días

Figura N°3. Se puede apreciar el desarrollo embrionario del erizo y los tiempos en que se produce cada estado.

Como parte de la evaluación toxicológica se realiza el tamizaje de la potencialidad genotóxica (determinar la toxicidad a nivel de ADN, genes y cromosomas), evaluando el daño a nivel de la estructura primaria del ADN, el ensayo de micronúcleos [31].

La **prueba de micronúcleos** (MN) en médula ósea es quizás el test de genotoxicidad *in vivo* más empleado, por ser un sistema simple y reproducible para determinar daño cromosómico, a la vez que brinda clara información sobre la proliferación celular en médula ósea [32-33]. Los MN son pequeñas formaciones nucleares que se presentan además de los dos núcleos típicos que se forman en la telofase. Generalmente se forman a consecuencia de un retraso de un cromosoma en anafase o de fragmentos de cromosomas que no se han incluido en ninguno de los núcleos telofásicos. Los micronúcleos generalmente no persisten, ni tampoco las células de las que forman parte, ya que el núcleo de la célula presenta un déficit correspondiente a los genes incluidos en el micronúcleo, son fácilmente distinguibles con tinción con Giemsa o empleando técnicas más complejas, como es el uso de antígenos marcadores de centrómero, o con técnicas de fluorescencia por hibridación *in situ*, las cuales permiten discernir si el compuesto indujo un evento clastogénico o aneugénico [34].

La prueba de los micronúcleos fue desarrollada por *Schmid* y colaboradores (1976), basándose en los siguientes principios: cuando un cromosoma se rompe, si el fragmento acéntrico se retrasa entre los polos y se transforma en un núcleo más pequeño que el núcleo principal, es llamado micronúcleo. El micronúcleo es formado durante la anafase/telofase y de este modo la división es requerida para el daño cromosómico/genómico para ser expresado como micronúcleo. Un aspecto fundamental para el ensayo de micronúcleos es la cinética de división. Un micronúcleo debe contener por ende un cromosoma(s) completo(s) o un fragmento(s) acéntrico(s). El hecho que los eventos que originan incremento de la frecuencia de MN han sido correlacionados con la formación de tumores, hacen de este ensayo un potente instrumento en el tamizaje de agentes genotóxicos, con la ventaja de ser aplicable *in vivo* a grandes poblaciones [35].

El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de sangre periférica, fue realizado de acuerdo a la metodología propuesta por *Schmid* en 1976 [39], capaz de predecir con un 91% de sensibilidad el potencial clastogénico y aneugénico en los eritrocitos policromáticos de la médula ósea de una sustancia determinada [43] Esta prueba cuantifica el porcentaje de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos que resultan de las rupturas cromosómicas, o la no disyunción por mal funcionamiento del uso mitótico debido a que la frecuencia espontánea de micronúcleos en las células es baja, ya que están en su proceso de maduración pierden el núcleo pero no el micronúcleo [41]. Con este procedimiento se obtiene una tinción sobre los eritrocitos que nos permite observar los micronúcleos. Se cuantifica el número de eritrocitos portadores de micronúcleos (PCE-MN) y se expresa como porcentaje con respecto al total de PCE observados (2000 por animal).

El ensayo de la morfología del espermatozoide en ratones, empleado como indicador de mutación en las células germinales, parte de la premisa de que un agente que induce formas anormales interfiere el proceso normal de diferenciación de las células germinales, existiendo evidencias experimentales que avalan su empleo como posible indicador de daño genotóxico, teniendo en cuenta la capacidad de muchos mutágenos de alterar la morfología del espermatozoide. Defectos en la morfología del espermatozoide han sido correlacionados con anomalías metabólicas, funcionales y estructurales en la descendencia [36]. Este ensayo generalmente se incluye dentro de los estudios subcrónicos y crónicos, facilitando un uso más óptimo de los animales de experimentación.

El ensayo de electroforesis alcalina en células individuales (Ensayo Cometa), permite detectar el daño al ADN en células individuales, detectando las rupturas de cadena y sitios lábiles al álcali en el ADN, al cuantificar la migración del ADN. Conocido como ensayo cometa por el patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas en este ensayo, este test deviene en un método de interés en los estudios de genética toxicológica, por su alto potencial de detección de daño al ADN, específicamente aquellos producidos por las rupturas de cadena, la formación de sitios

lábilis al álcali, y los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteínas en células eucariotas obtenidas tanto de estudios *in vivo* como *in vitro* [37-38].

Morinda citrifolia L. (Noni) es una especie que pertenece a la familia Rubiáceae, es una de las plantas medicinales tradicionales más importantes en Polinesia a la cual se le ha atribuido efectos relacionados con actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, antihelmíntica, analgésica, antiinflamatoria, hipotensora e inmunoestimulante [48,49]. Crece en muchas partes del mundo especialmente en ambientes tropicales, razón por la cual se ha adaptado al suelo del Perú. Esta especie crece y se desarrolla en la selva peruana:

- Departamento de Amazonas, es uno de los 24 departamentos del Perú, abarca una superficie de 39,249.13 km² con 7 provincias y 83 distritos; conforma parte de la Región Nororiental del Marañón.

- Bagua, es una de las siete provincias del departamento de Amazonas, limita al oeste con el departamento de Cajamarca, por el norte y este con provincia de Condorcanqui y por el sur con la provincia de Utcubamba.

- Su capital Bagua Chica, se ubica en la margen derecha del río Utcubamba a pocos Km. del Pongo de Rentema, sus cinco distritos son: Cercado de Bagua, Aramango, Copallín, El Parco, Imaza, La Peca.

- La localidad rural de Achaguay Bajo es una de las 50 localidades del distrito de La Peca de la ciudad de Bagua Chica, ubicada entre los 78°30'4" longitud oeste y 5°36'3" latitud sur, a 450 msnm, conformado en la actualidad con 49 viviendas.

El jugo del fruto de Noni ha sido aceptado como un nuevo alimento por la Comisión Europea en 2003. El conocimiento sobre la composición química de fruta de Noni ha aumentado considerablemente durante los recientes años. Un número de estudios *in vitro* y, hasta cierto punto, estudios *in vivo* muestran un rango de efectos potencialmente beneficiosos. Sin embargo, carecen esencialmente de información clínica. En la actualidad no está clara hasta qué punto los resultados de los estudios farmacológicos experimentales son de relevancia clínica [47]. El asunto de seguridad ha sido reexaminado en Europa debido a los recientes reportes de casos de hepatotoxicidad por Noni, se observó que la causalidad de daño hepático por jugo de Noni era probado. Un hombre con una previa hepatotoxicidad por paracetamol desarrolló insuficiencia

hepática sub-aguda luego del consumo de 1,5L de jugo del fruto de Noni por tres semanas, mientras que una mujer sin evidencia de una previa enfermedad hepática desarrolló un episodio de hepatitis aguda luego del consumo de 2L de jugo del fruto de Noni por más de 3 semanas. Es muy probable que los componentes hepatotóxicos del jugo del fruto de *Morinda citrifolia* se deba a las antraquinonas [54].

Ante esta situación se empezaron a realizar estudios sobre el fruto del *Morinda citrifolia*, en uno de ellos se evaluó los signos de toxicidad por el extracto acuoso de Noni, tras la administración diaria de 1g/kg de peso corporal a ratas *Sprague Dawley* durante 28 días, los resultados reflejaron ligeras variaciones entre grupos sin significación biológica, ya que todos los parámetros se encontraron dentro del rango fisiológico normal establecido a partir de los controles. No se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas [11]. También se evaluó mediante el ensayo microsomal en *Salmonella typhimurium* el extracto concentrado de Noni, conteniendo flavonoides ha demostrado efecto mutagénico en la cepa TA1537. No se observó mutagenicidad en la prueba de mamíferos con V79 en fibroblastos de hámster chinos, no mostrándose reparación en la síntesis de ADN en hepatocitos primarios, tampoco pudieron ser observados aductos de ADN o roturas de hebras de ADN. Se concluyó que en el análisis químico y pruebas de genotoxicidad el jugo de Noni no tiene un potencial genotóxico y que antraquinonas genotóxicas no existen en el jugo del Noni [43].

Una de las pruebas es el ensayo de citotoxicidad en huevos fertilizados de erizo de mar el cual ha sido utilizado ampliamente por biólogos y bioquímicos debido a la simplicidad y tamaño de las células, características que permiten visualizar resultados con relativa facilidad en estudios sencillos de división celular hasta en aquellos que incluyen un fuerte componente molecular [45]. Es también útil para el estudio de la acción de drogas, ya que el embrión se expone a la droga durante los mismos estados del ciclo celular, lográndose de esta forma, un alto grado de reproducibilidad así como de uniformidad en estudios farmacológicos [46].

Estudios realizados por Wang y colaboradores, demuestran el efecto citotóxico del Noni sobre una línea celular de leucemia, a diversas concentraciones. La citotoxicidad del Noni sobre cultivos de células neoplásicas quedó demostrada al inducir necrosis de las células cancerosas a altas dosis y apoptosis a menores dosis [47].

En 1993, Hiramatsu y colaboradores reportaron los efectos del jugo de Noni sobre las células K-Ras-NRK. El Damnacanthal, un compuesto antraquinónico, aislado de las raíces de Noni, es un inhibidor de la función Ras. Se cree que el oncogene ras está asociado con la transducción de señales en varios cánceres humanos, como los de pulmón, colon, páncreas y leucemia [48,49].

Posteriormente se realizó un estudio para evaluar los efectos citotóxicos *in vitro* del extracto acuoso y etanólico del fruto de Noni sobre HMEC (Células epiteliales mamarias humanas), MCF-7 (cáncer de mama) y una variante de MCF-7(MCF-7i). Los datos iniciales indican que la fruta de *Morinda citrifolia* demostró citotoxicidad general y su efecto fue similar sobre las células epiteliales normales mamarias HMEC, células de cáncer mamaria invasivos y no invasivos MCF-7 y MCF-7i [50].

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

2. 1. a. *Obtención del material vegetal*

Material vegetal. La especie en estudio, *Morinda citrifolia* (Noni), fue recolectada en la localidad de Achaguay, Provincia de Bagua chica, departamento de Amazonas.

2. 1. b. *Metodología de obtención del extracto*

Se prepararon las soluciones de ensayo de acuerdo a la siguiente metodología:

Extracto alcohólico. Se obtuvo el jugo del fruto de *Morinda citrifolia*, el cual fue sometido a maceración con etanol al 96% por 7 días en un frasco de color ámbar, luego se procedió al filtrado, el líquido obtenido fue colocado en una estufa con aire circulante a 40° C hasta sequedad.

Extracto acuoso. Se obtuvo el jugo del fruto de *Morinda citrifolia*, se agregó agua destilada, se agitó y se cubrió cuidadosamente dejándose en reposo durante 24 horas, luego se procedió al filtrado, el líquido obtenido fue colocado en una estufa con aire circulante a 40° C hasta su sequedad.

2.2 EVALUACIÓN GENOTÓXICA

Las pruebas se ejecutaron siguiendo las directrices de la OECD para los ensayos de Genotoxicidad [6].

A.- Animales de ensayo. Se realizó el ensayo de micronúcleos en ratones Balb/c: NMRI que tenían entre 8 y 12 semanas de edad y 30 g de peso corporal que fueron suministrados por el Bioterio del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB), Instituto Nacional de Salud.

B.- Condiciones de mantenimiento y alimentación. Se mantuvieron en un período de cuarentena de 7 días en el Bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), bajo condiciones controladas

de temperatura (21 a 25° C) y con ciclos normales de luz–oscuridad de 12 horas, para eliminar el estrés de la transportación y lograr su adaptación a las nuevas condiciones. Una vez concluída esta etapa se procedió al pesaje individual de los animales utilizando la balanza. Luego fueron distribuidos aleatoriamente y ubicados por grupos de tratamiento, los cuales se distribuyeron en cajas de polipropileno de alta densidad, con viruta que era cambiada tres veces por semana. Los animales fueron identificados mediante tarjetas colocadas en sus cajas, donde se registró: sexo, peso inicial, fecha de administración, fecha de sacrificio y cualquier otro dato pertinente. Fueron alimentados con dieta obtenida del Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y agua *ad libitum* para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

C.-Grupos experimentales. Para la evaluación del efecto genotóxico se establecieron ocho grupos experimentales:

Tabla N°1. Distribución de los grupos experimentales en el ensayo de micronúcleos en sangre de ratón.

GRUPOS	ADMINISTRACIÓN	N°RATONES	SUSTANCIA ADMINISTRADA
Grupo 1	Control negativo	8	Agua destilada (Vehículo del extracto)
Grupo 2	Control positivo	8	Ciclofosfamida 40 mg/kg de peso corporal
Grupo 3	Extracto etanólico	8	Dosis de 500 mg/kg
Grupo 4	Extracto etanólico	8	Dosis de 1000 mg/kg
Grupo 5	Extracto etanólico	8	Dosis de 2000 mg/kg
Grupo 6	Extracto acuoso	8	Dosis de 500 mg/kg
Grupo 7	Extracto acuoso	8	Dosis de 1000 mg/kg
Grupo 8	Extracto acuoso	8	Dosis de 2000 mg/kg

Origen: Matriz de la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón. Fuente propia.

Se utilizó como control positivo la Ciclofosfamida (GENOSAL, 1g/VIAL PRASFARMA) a dosis única de 40mg/kg de peso corporal en un volumen de 10mL/kg con ayuda de una cánula para administración oral, el cual se diluyó en solución salina

(NaCl) al 0,9%. La solución se administró inmediatamente después de ser preparada [51].

D.- Duración del ensayo y dosificación. Se realizaron 2 administraciones consecutivas con intervalos de 24 horas, para luego proceder al sacrificio 48 horas después de iniciada la primera administración. Este tiempo de muestreo está basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones [33]. Los grupos tratados recibieron los extractos diluidos en agua destilada, para ser aplicadas en un volumen de 10mL/kg de peso corporal por vía oral, mediante el uso de una cánula.

El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de sangre periférica, fue realizado de acuerdo a la metodología propuesta por *Schmid* [39]. La toma de muestra consistirá en la obtención de pequeñas cantidades de sangre periférica y realización de frotices de sangre (2 a 4 réplicas por individuo), secado en horas de los mismos para luego ser teñidos con colorante Giemsa 1% (previo filtrado de los mismos). Las observaciones consistirán en el conteo de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros o inmaduros. Se contarán un aproximado de 1000 eritrocitos por individuo, en campos oculares a 400 aumentos.

E.- Resultados. Las pruebas estadísticas de datos usados con una significación estadística del incremento del porcentaje micronúcleos en eritrocitos en una o más dosis con respecto al control negativo. Como criterio de toxicidad se tomó la significación $p < 0,05$.

2.3. TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS EN RATAS

Las pruebas se ejecutaron siguiendo las directrices de la OECD para los ensayos de toxicidad [12].

A.- Animales de ensayo. Se emplearon 21 ratas albinas de raza Holtzman, peso promedio 170–200 gramos que fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

B.- Condiciones de mantenimiento y alimentación. Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24 horas, continuando esta observación

diariamente durante un período de cuarentena de 7 días en el Bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, bajo condiciones controladas de temperatura (21 a 25° C) y con ciclos normales de luz –oscuridad de 12 horas, para eliminar el estrés de la transportación y lograr su adaptación a las nuevas condiciones. Una vez concluida esta etapa se procedió al pesaje individual de los animales. Luego fueron distribuidos aleatoriamente y ubicados por grupos de tratamiento, los cuales se distribuyeron en jaulas metálicas de 85x30x20 centímetros, con viruta que era cambiada tres veces por semana. Los animales fueron identificados mediante tarjetas colocadas en sus cajas, donde se registró: sexo, peso inicial fecha de administración, fecha de sacrificio y cualquier otro dato pertinente. Fueron alimentados con dieta obtenida del Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y agua *ad libitum* para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

C.-Grupos experimentales. Para la evaluación del efecto tóxico se establecieron tres grupos experimentales, cada uno constituido por siete ejemplares:

Tabla N°2. Distribución de los grupos experimentales para el ensayo de toxicidad a dosis repetidas

GRUPOS	ADMINISTRACIÓN	N° RATAS	SUSTANCIA ADMINISTRADA
Grupo 1	Control negativo	7	SSF (Solución salina fisiológica)
Grupo 2	Extracto etanólico	7	dosis 1000 mg/kg
Grupo 3	Extracto acuoso	7	dosis 1000 mg/kg

Origen: Matriz de la prueba de Toxicidad a Dosis Repetidas por 60 días. Fuente propia.

D.- Duración del ensayo y dosificación. El ensayo tuvo una duración de 60 días, realizándose administraciones durante 6 días por semana. Se empleó un solo nivel de dosis para la sustancia de ensayo, 1000mg/kg de peso corporal. La sustancia se administró por vía oral mediante una cánula metálica curva. Se realizaron ajustes semanales del volumen de administración en base a las variaciones de peso corporal del grupo tratado, utilizando un volumen límite de 10mL/kg de peso corporal.

E.- Observaciones clínicas. Las observaciones de los parámetros utilizados fueron realizadas diariamente. Incluyeron cambios de piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora, y patrón de comportamiento tales como irritabilidad, agresividad, intranquilidad y depresión severa. Se prestó atención a la posible ocurrencia de algunos signos como diarrea, letargo, salivación, sueño y convulsiones.

F.- Peso corporal y consumo de agua y alimento. Semanalmente se controló el peso corporal de todos los animales, así como el consumo de agua y alimento (Al finalizar el estudio se promedió el peso de los animales por semana y grupo).

G.- Exámenes de Laboratorio Clínico. Se realizaron a los 60 días exámenes de hematología y de química sanguínea. Las muestras de sangre fueron extraídas por punción cardíaca de los animales previamente anestesiados y tras ayuno de 12 horas. A todos los animales de cada grupo experimental se tomaron muestras de sangre, las cuales fueron recolectadas en viales de seguridad Eppendorf de un volumen de 2 mL que contenían una gota de EDTA al 10%. Los parámetros hematológicos evaluados fueron: Hematocrito (Hcto), Hemoglobina (Hb) y leucocitos totales (L); mientras que los parámetros bioquímicos evaluados fueron: Colesterol (CT), glucosa (G), triglicéridos (TG), (HDL), úrea (U), (TGP), fosfatasa alcalina (FA).

H.- Patología. Al finalizar el ensayo de toxicidad a dosis repetidas, se sacrificaron los animales de los grupos experimentales. Los animales se desangraron, previamente fueron anestesiados con pentobarbital, y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación se realizó una necropsia, para hacer el examen anatomopatológico e histopatológico correspondiente. Se examinó y se obtuvieron los siguientes órganos: cerebro, hígado, bazo, corazón, pulmón, tracto gastrointestinal (estómago 2 partes, duodeno y colon), útero, conductos ováricos y riñones; se conservaron en una solución de formol al 10% para posterior estudio y determinación del daño patológico. Se procesó histopatológicamente los órganos mencionados anteriormente, estos fueron seccionados y dispuestos, la tinción de preparaciones fue

realizado con hematoxilina y eosina, y descritas al observarlas bajo un microscopio simple, NIKON.

I.- Resultados. Los datos fueron evaluados a través de la estadística descriptiva expresando en valores medios \pm un error estándar de la media y porcentajes, y por la estadística inferencial considerando un $p < 0,05\%$ con la prueba de ANOVA y Comparaciones Múltiples (LSD).

2.4. EVALUACIÓN CITOTÓXICA

Se recolectó los erizos de mar, en condiciones lo más naturales posibles, trasladándolos en agua de mar a una temperatura entre 10-15° C, y en el menor tiempo posible al Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Obtención de gametos. Se abrió el erizo cuidadosamente con ayuda de una tijera de disección, haciendo una incisión en la parte inferior (**Figura N°1**). Se determinó el sexo del animal, a través de la observación del color de los gametos, color crema en el caso de los machos y color granate en el caso de las hembras; se extrajo los racimos de óvulos de 4 a 5 erizos hembras depositándolos en un beaker con 200mL de agua de mar (10-12° C) para obtener los huevos, se usó un oxigenador para mantenerlos viables, luego se lavó los óvulos, con la finalidad de eliminar el tejido celómico, se decantó el agua sobrenadante y se reemplazó con agua de mar fría. Estos huevos estuvieron listos para la fertilización, a diferencia de las gónadas masculinas que una vez obtenidas fueron colocadas en refrigeración.

Fertilización. En un beaker que contenía los 200mL de agua de mar con los óvulos listos para ser fecundados, se añadió 300mL de agua de mar filtrada, sobre el mismo beaker se agregó una gota de espermatozoides secos, se agitó para que ocurriera la fecundación (**Figura N°2**). Se transfirió una alícuota de la suspensión de óvulos y espermatozoides a una lámina portaobjetos, con la finalidad de observar al microscopio (**Figura N°3**) la membrana de fertilización, la cual es apreciable por la formación de un halo alrededor del ovocito rodeado de los espermatozoides (**Figura N°4**).

Preparación del extracto. Los extractos de *Morinda citrifolia* se diluyeron con agua de mar filtrada fría, no se requirió de DMSO para facilitar la solubilización debido a que los extractos eran solubles en el agua de mar, sobre la base de la cantidad de muestra obtenida inicialmente se procedió a trabajar con tres concentraciones.

❖ **Extracto etanólico:** 0,4mg, 0,2mg y 0,1mg/mL.

❖ **Extracto acuoso:** 0,4mg, 0,2mg y 0,1mg/mL.

Enfrentamiento del extracto con la muestra fecundada. Se sometieron los extractos al bioensayo de citotoxicidad en erizos de mar. Se marcaron los viales con las concentraciones respectivas de cada una de los extractos, realizándose este procedimiento por triplicado, a cada vial se agregó 1mL de cada concentración de los extractos obtenidos, luego se añadió 2mL de la suspensión de los ovocitos fecundados. El grupo control del ensayo contenía 1mL de agua de mar filtrada con 2mL de los huevos fecundados.

Los viales con las diferentes concentraciones de cada fracción fueron colocadas en la plataforma del agitador magnético, a 1000 RPM (revoluciones por minuto) en un ambiente con temperatura controlada de 15° C + 0,1.

Se realizaron las observaciones en un estereoscopio hasta que el control negativo llegó a realizar su clivaje, lo cual ocurrió a las 4 horas, las siguientes lecturas se realizaron a las 24 y 48 horas, contabilizándose alrededor de 100 embriones por cada vial.

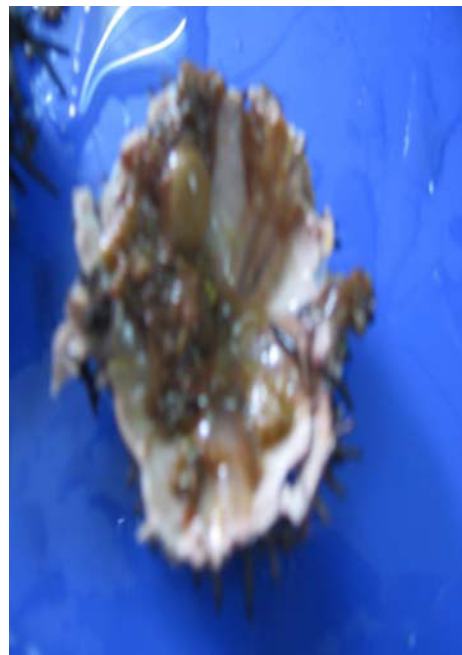
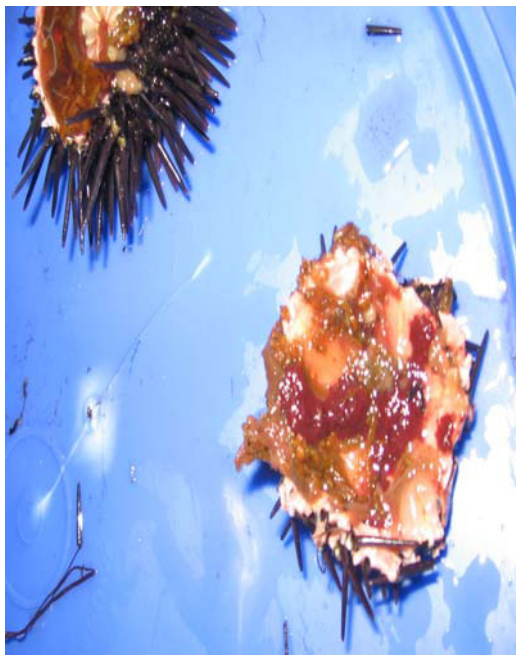


Figura N°3. Disección e identificación de los gametos sexuales de los erizos de mar.

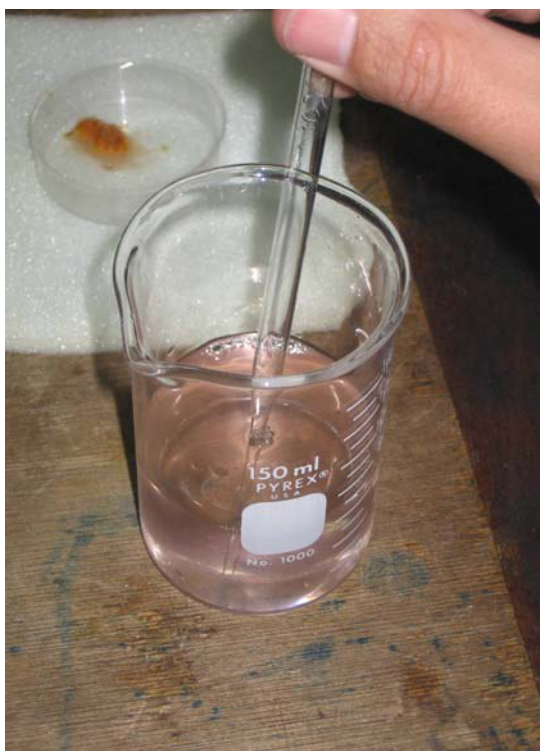


Figura N°4. Preparación de la Suspensión de ovocitos.



Figura N°5. Microscopio donde se observó la fecundación de los ovocitos en campo oscuro y claro.



(A)



(B)

Figura N°6. Formación de la membrana de fertilización. (A) Observación en campo oscuro, observación de los espermatozoides alrededor del ovocito fecundado. (B) Observaciones campo claro, membrana de fertilización alrededor del ovocito.

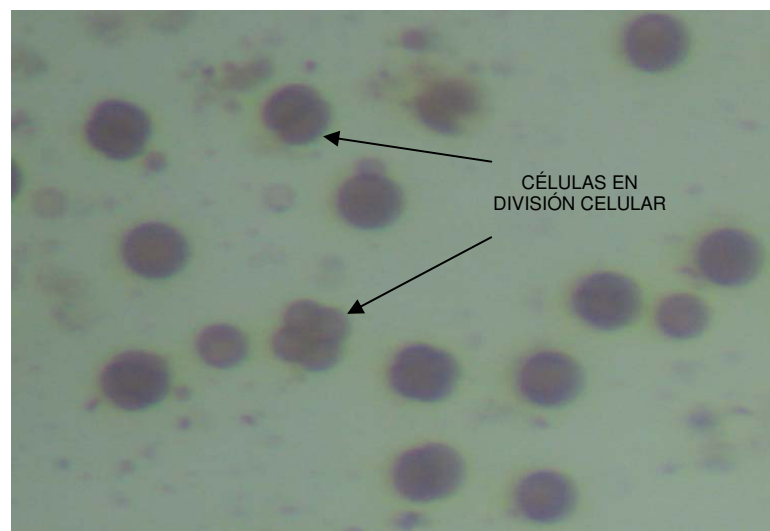


Figura N°7. Observación de los ovocitos fecundados en división celular

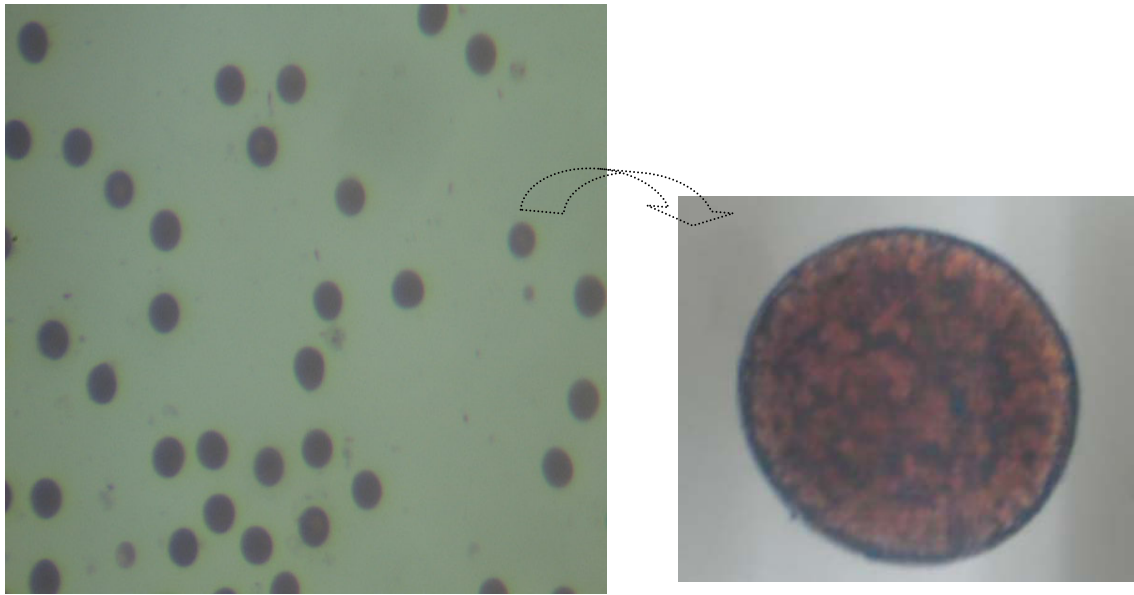


Figura N°8. Desarrollo embrionario de células de erizo de mar, estadio blastular.

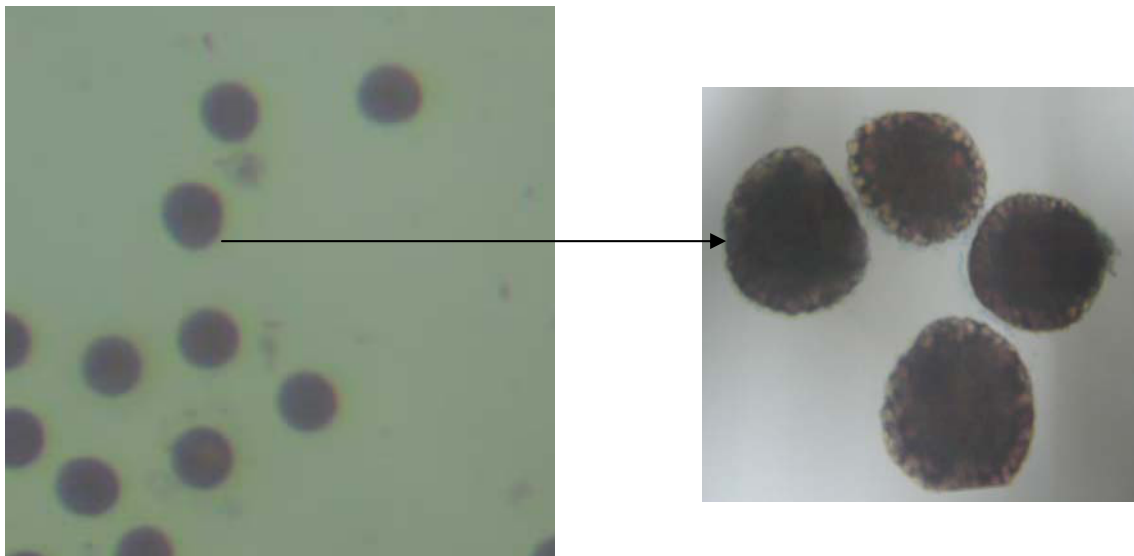


Figura N°9. Desarrollo embrionario de células de erizo de mar, estadio gastrular

2.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO

Se evaluó el extracto etanólico de *Morinda citrifolia* mediante cromatografía en papel descendente la que permitió separar los metabolitos, revelándose con lámpara UV y vapores de amoníaco (**Figura N°8**), las fracciones reveladas fueron eluídas con metanol, para una posterior elucidación estructural el cual se recomienda en este trabajo. Para la determinación de antraquinonas se realizó la reacción de Bortränger y para la de flavonoides la reacción de Shinoda.

FASE ESTACIONARIA: papel Whatman N° 1 de 12 x 30 cm.

FASE MÓVIL: sistema de solvente agua: ácido fórmico: etilmetilcetona: acetato de etilo 1:1:3:5v/v, se preparó de un día a otro utilizándose la fase superior. El desarrollo se efectuó en una cuba cromatográfica (sistema descendente).

REVELADOR: luz UV y vapores de amoníaco + luz UV.

Se recortaron las bandas fluorescentes y se eluyeron en metanol obteniéndose las fracciones A, B y C.

Se procedió a la identificación de cada fracción obtenida con la reacción de SHINODA.

III. RESULTADOS

3.1. EVALUACIÓN GENOTÓXICA

Tabla N°3. Análisis estadístico de los datos obtenidos al evaluar micronúcleos en sangre periférica de ratones con Ciclofosfamida y los extractos de *Morinda citrifolia* administrados por vía oral.

Variable	Administración	Índice de genotoxicidad (Valores medios)	Error estándar	% Variación
Micronúcleos	Agua destilada (Vehículo del extracto)	0,0	0,0	0,00%
Micronúcleos	Ciclofosfamida 40mg/kg	3,9	0,9	100,00%
Micronúcleos	Extracto acuoso 500mg/kg	0,4	0,2	10,26%
Micronúcleos	Extracto acuoso 1000mg/kg	0,9	0,3	23,07%
Micronúcleos	Extracto acuoso 2000mg/kg	0,7	0,3	17,95%
Micronúcleos	Extracto etanólico 500mg/kg	0,8	0,3	20,50%
Micronúcleos	Extracto etanólico 1000mg/kg	0,4	0,2	10,26%
Micronúcleos	Extracto etanólico 2000mg/kg	0,9	0,3	23,07%

Tabla N°4. Análisis estadístico de los datos obtenidos al evaluar el número de monocitos en sangre periférica de ratas tratadas con Ciclofosfamida y los extractos de *Morinda citrifolia* administrados por vía oral.

Variable	Administración	Valores medio	Intervalo confianza 95%
Monocitos	Agua destilada (Vehículo del extracto)	4,1	$\pm 2,1$
Monocitos	Ciclofosfamida 40mg/kg	15,9	$\pm 2,5$
Monocitos	Extracto acuoso 500mg/kg	3,4	$\pm 1,2$
Monocitos	Extracto acuoso 1000mg/kg	19,7	$\pm 2,3$
Monocitos	Extracto acuoso 2000mg/kg	28,3	$\pm 4,5$
Monocitos	Extracto etanólico 500mg/kg	21,0	$\pm 3,2$
Monocitos	Extracto etanólico 1000mg/kg	10,1	$\pm 1,5$
Monocitos	Extracto etanólico 2000mg/kg	32,0	$\pm 9,0$

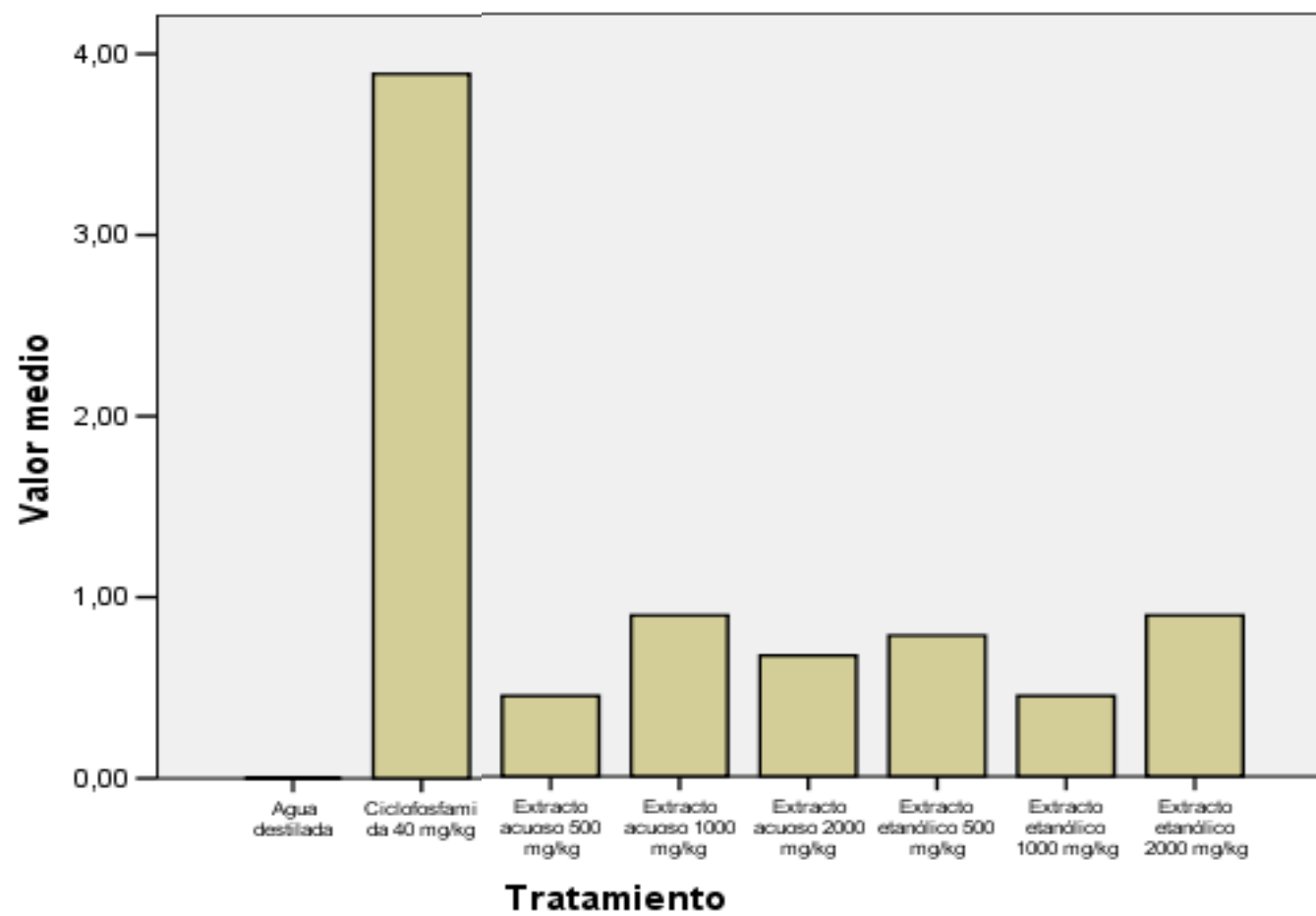


GRÁFICO Nº1 EFECTO EN EL NÚMERO DE MICRONUCLEOS DE LA SANGRE CIRCULANTE EN RATONES

3.2 . TOXICIDAD A DOSIS REPETIDAS EN RATAS.

3.2.1 Observaciones clínicas

El ensayo concluyó con 100% de supervivencia. De forma general no se observaron alteraciones en los signos clínicos evaluados, no sufriendo variación el comportamiento normal de los animales de experimentación.

3.2.2 Peso corporal, consumo de agua y alimento.

En el gráfico N°2, podemos observar que la tendencia a la reducción del peso corporal fue constante entre los grupos que recibieron los extractos de *Morinda citrifolia*, observándose una mayor reducción en el grupo que recibió el extracto etanólico. No se apreció una disminución del consumo de alimento durante el estudio, mientras que el consumo de agua fue similar en todos los grupos. No se encontró diferencias significativas entre todos los grupos estudiados.

3.2.3 Hematología

Los resultados se presentan en la tabla N°4. El análisis estadístico puso de manifiesto diferencias significativas entre los individuos tratados con el extracto etanólico y el control con respecto a los valores de hemoglobina y leucocitos totales, mientras que los tratados con el extracto acuoso y el control se observó una diferencia significativa con respecto a los valores de hematocrito y leucocitos totales.

3.2.4 Bioquímica

Los resultados se presentan en la tabla N°5. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los individuos que recibieron tanto el extracto etanólico como el extracto acuoso con respecto al grupo control, a nivel de todos los parámetros bioquímicos evaluados.

3.2.5 Patología

No se produjo la muerte de ninguno de los animales de experimentación durante todo el desarrollo del tratamiento, por lo que todos los animales fueron sacrificados al

término del ensayo. No se encontraron lesiones macroscópicas atribuibles al extracto evaluado.

Tabla N°5. Registro de peso corporal

Grupo tratamiento	Semana de tratamiento								
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Quinta	Sexta	Séptima	Octava	Novena
Grupo extracto etanólico	206,86	224,57	236,00	238,57	246,14	246,71	252,86	259,29	259,57
Grupo extracto acuoso	208,43	234,43	236,57	245,71	244,29	248,43	261,57	256,71	256,71
Control	206,83	223,67	240,00	250,00	262,17	270,00	274,67	272,50	275,83

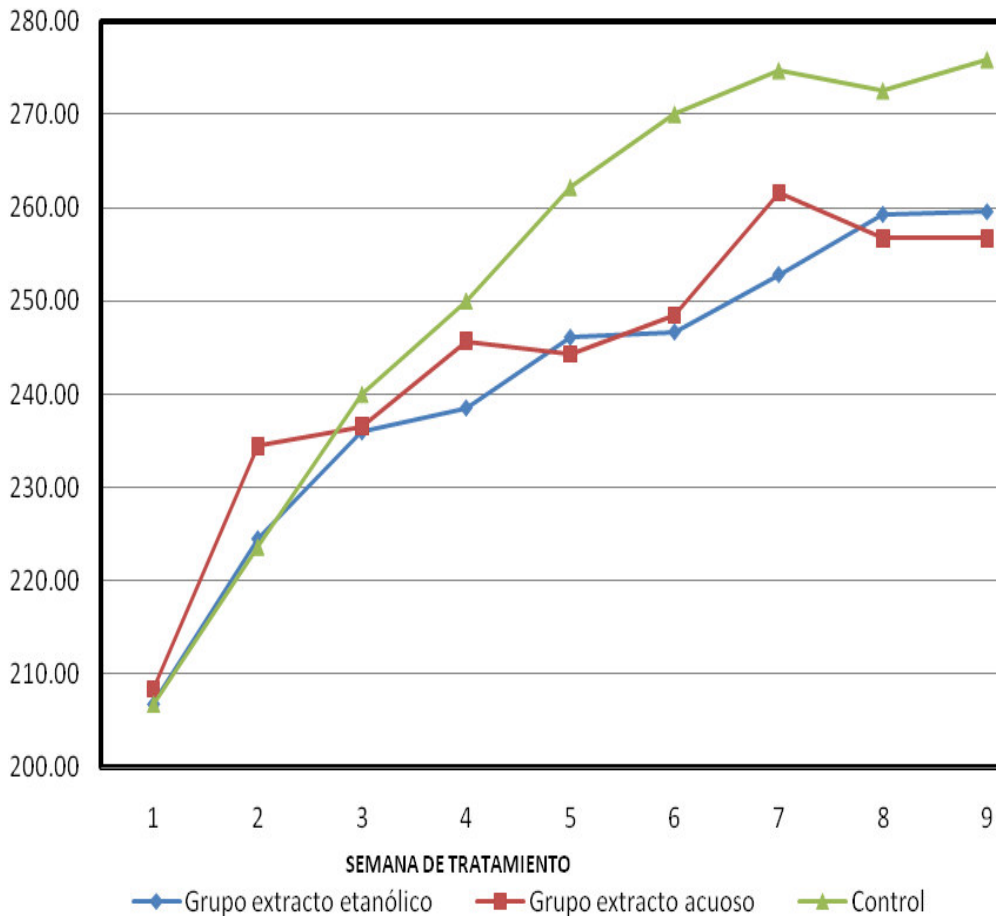


GRÁFICO N° 2. Registro de variación de peso corporal

Tabla N°6. Análisis descriptivos de los parámetros hematológicos

Parámetros	Administración	Valores	Unidades	Desviación estándar \pm	
Hematológicos		medios		Error estándar	
Hemoglobina	Normal (SSF)	11,11	g/dL	2,12	$\pm 0,80$
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	12,06	g/dL	1,37	$\pm 0,52$
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	11,60	g/dL	1,96	$\pm 0,74$
Hematocrito	Normal (SSF)	34,71	%	5,44	$\pm 2,06$
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	37,57	%	2,57	$\pm 0,97$
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	37,14	%	5,87	$\pm 2,22$
Leucocitos	Normal (SSF)	7,04	$\times 10^3$ unid/ μ L	2,12	$\pm 0,80$
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	7,91	$\times 10^3$ unid/ μ L	2,21	$\pm 0,84$
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	6,86	$\times 10^3$ unid/ μ L	2,32	$\pm 0,88$

VARIABLES HEMATOLÓGICAS

**Niveles de hemoglobina (Hb) en ratas
por administración oral durante 60
días**

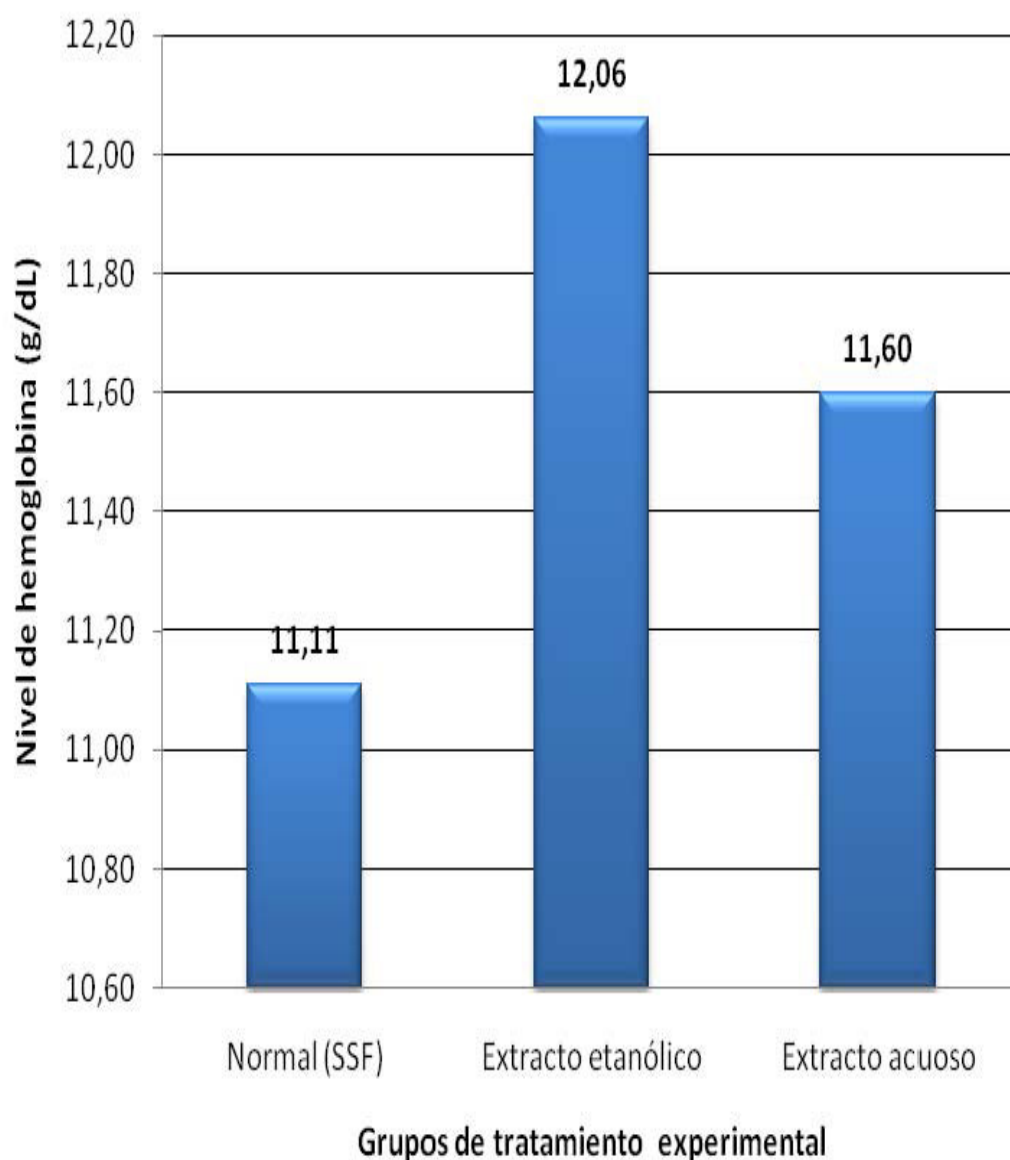


GRÁFICO Nº 3. Niveles de hemoglobina en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de Hematocrito en ratas por administración oral durante 60 días

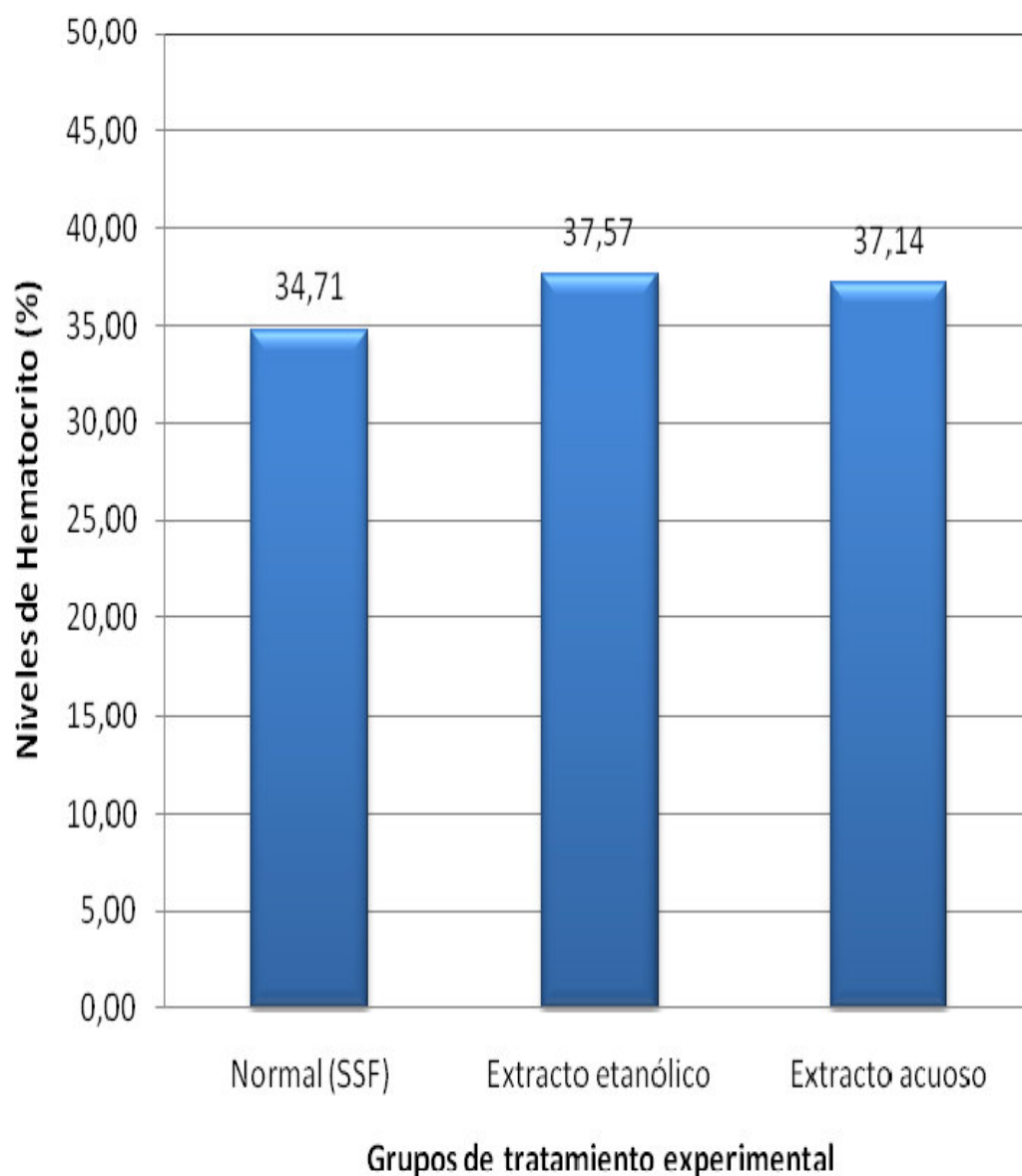


GRÁFICO N° 4. Niveles de hematocrito en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de Leucocitos Totales en ratas por administración oral durante 60 días

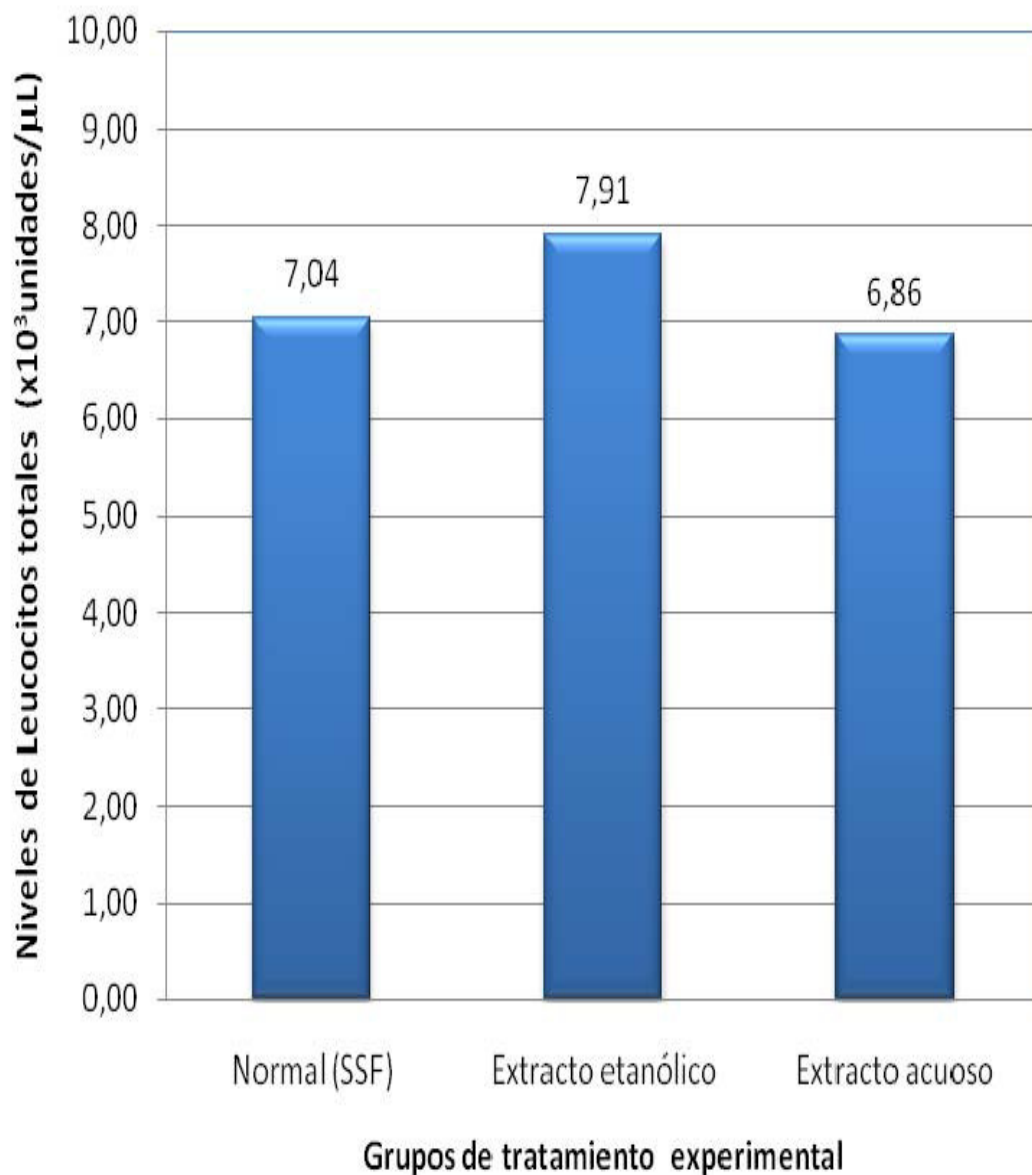


GRÁFICO Nº 5. Niveles de leucocitos totales en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Tabla N°7. Análisis descriptivos de los parámetros bioquímicos.

Parámetros	Administración	Valores	Unidades	Desviación estándar \pm
Bioquímicos		medios		Error estándar
Colesterol	Normal (SSF)	172,29	mg/100mL	27,46 \pm 10,38
total	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	153,57	mg/100mL	33,40 \pm 12,62
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	155,29	mg/100mL	22,43 \pm 8,48
HDL	Normal (SSF)	47,00	mg/100mL	10,65 \pm 4,02
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	53,71	mg/100mL	10,73 \pm 4,06
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	43,29	mg/100mL	6,32 \pm 2,39
Triglicéridos	Normal (SSF)	121,43	mg/100mL	15,60 \pm 5,90
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	133,86	mg/100mL	23,48 \pm 8,87
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	148,00	mg/100mL	28,84 \pm 10,90
Glucosa	Normal (SSF)	82,29	mg/dL	13,98 \pm 5,29
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	89,43	mg/dL	7,87 \pm 2,97
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	89,14	mg/dL	14,55 \pm 5,50
Urea	Normal (SSF)	20,57	mg/dL	8,56 \pm 3,24
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	22,00	mg/dL	6,71 \pm 2,54
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	17,00	mg/dL	4,47 \pm 1,69
TGP	Normal (SSF)	12,57	unidades/L	1,72 \pm 0,65
	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	13,57	unidades/L	4,93 \pm 1,86
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	14,86	unidades/L	7,10 \pm 2,69
Fosfatasa	Normal (SSF)	115,14	unidades/L	38,75 \pm 14,65
alcalina	Etanólico <i>Morinda citrifolia</i>	144,57	unidades/L	19,26 \pm 7,28
	Acuoso <i>Morinda citrifolia</i>	145,00	unidades/L	16,46 \pm 6,22

VARIABLES BIOQUÍMICAS

**Niveles de colesterol en ratas por
administración oral durante 60
días**

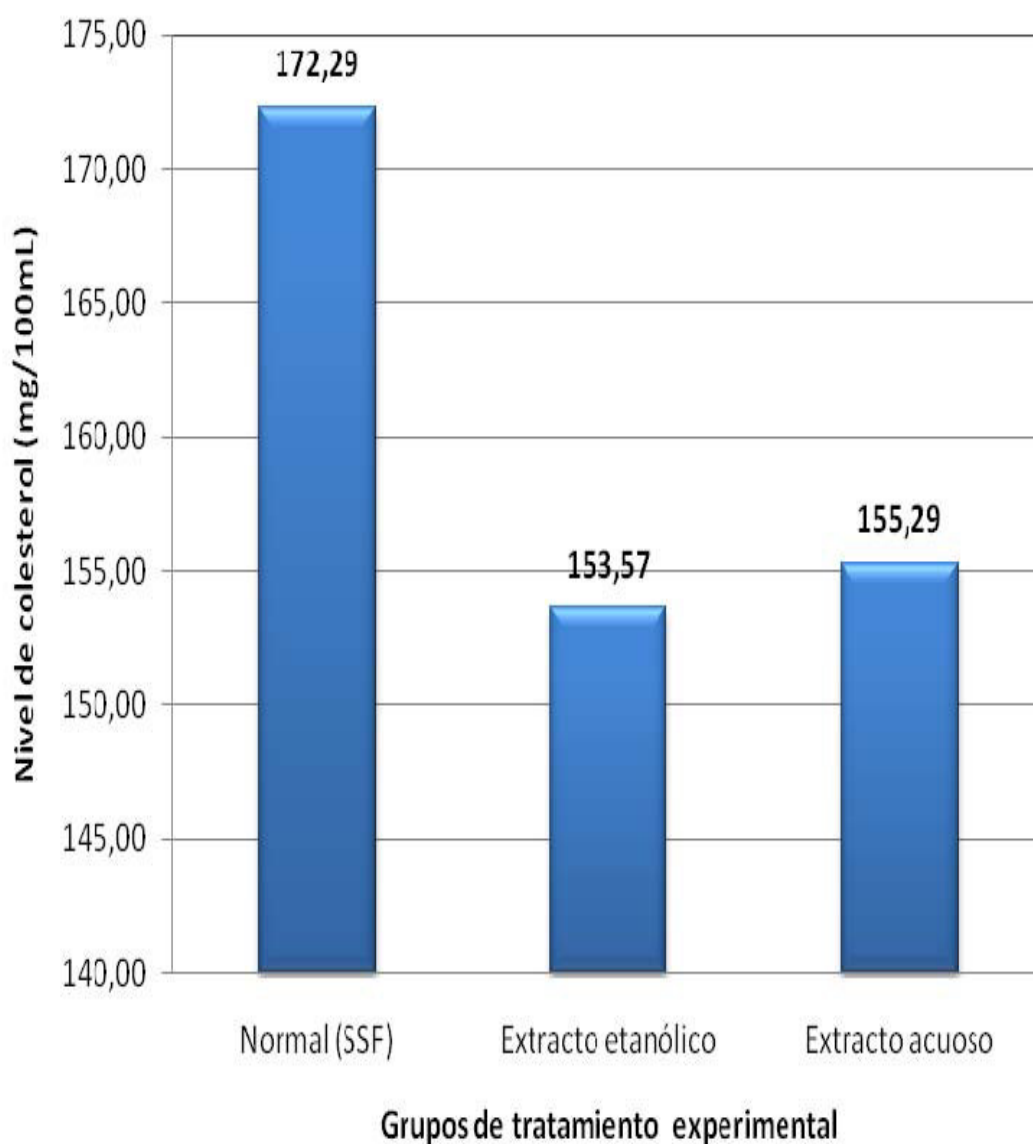


GRÁFICO N°6. Niveles de colesterol en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de HDL en ratas por administración oral durante 60 días

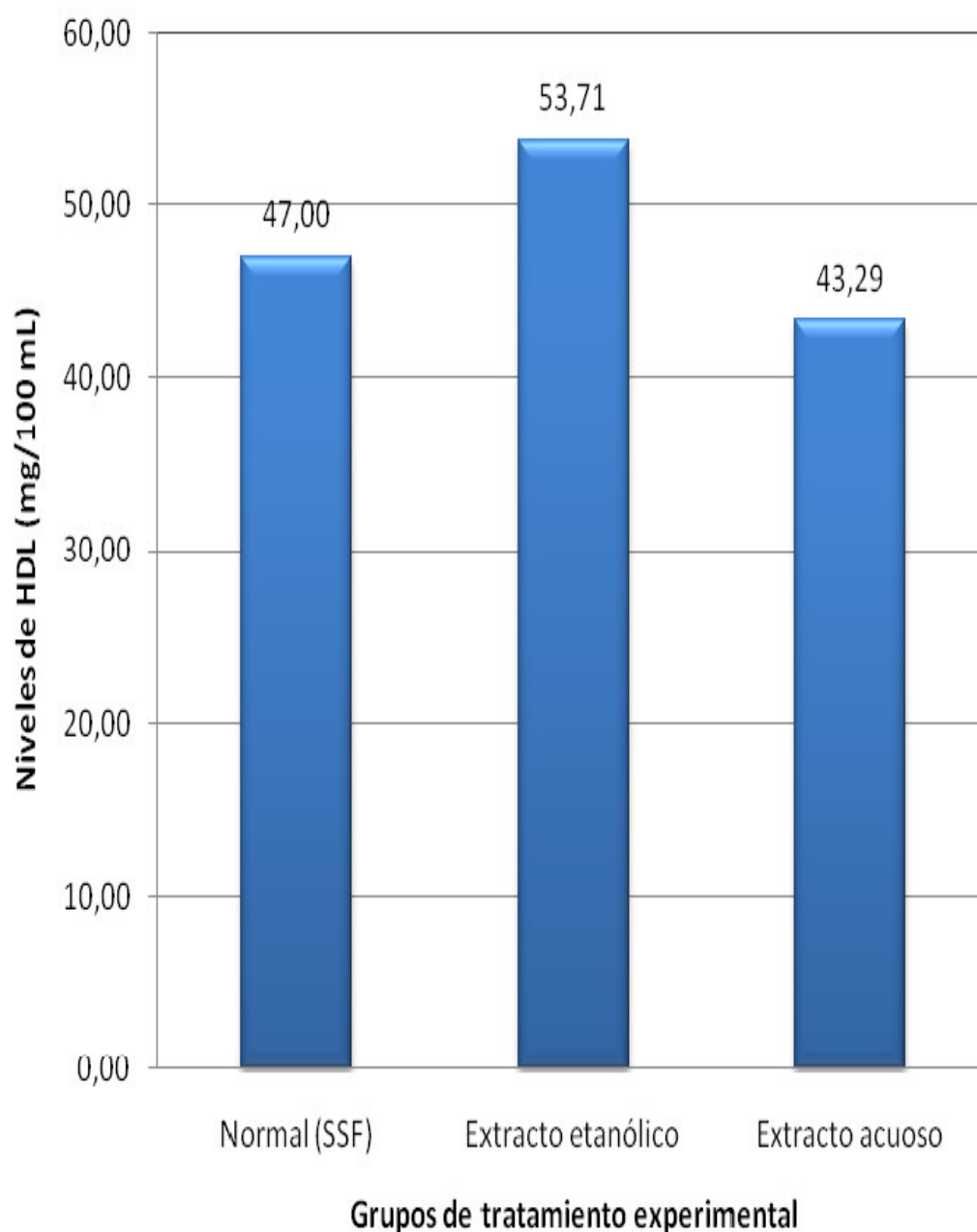


GRÁFICO N° 7. Niveles de HDL en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

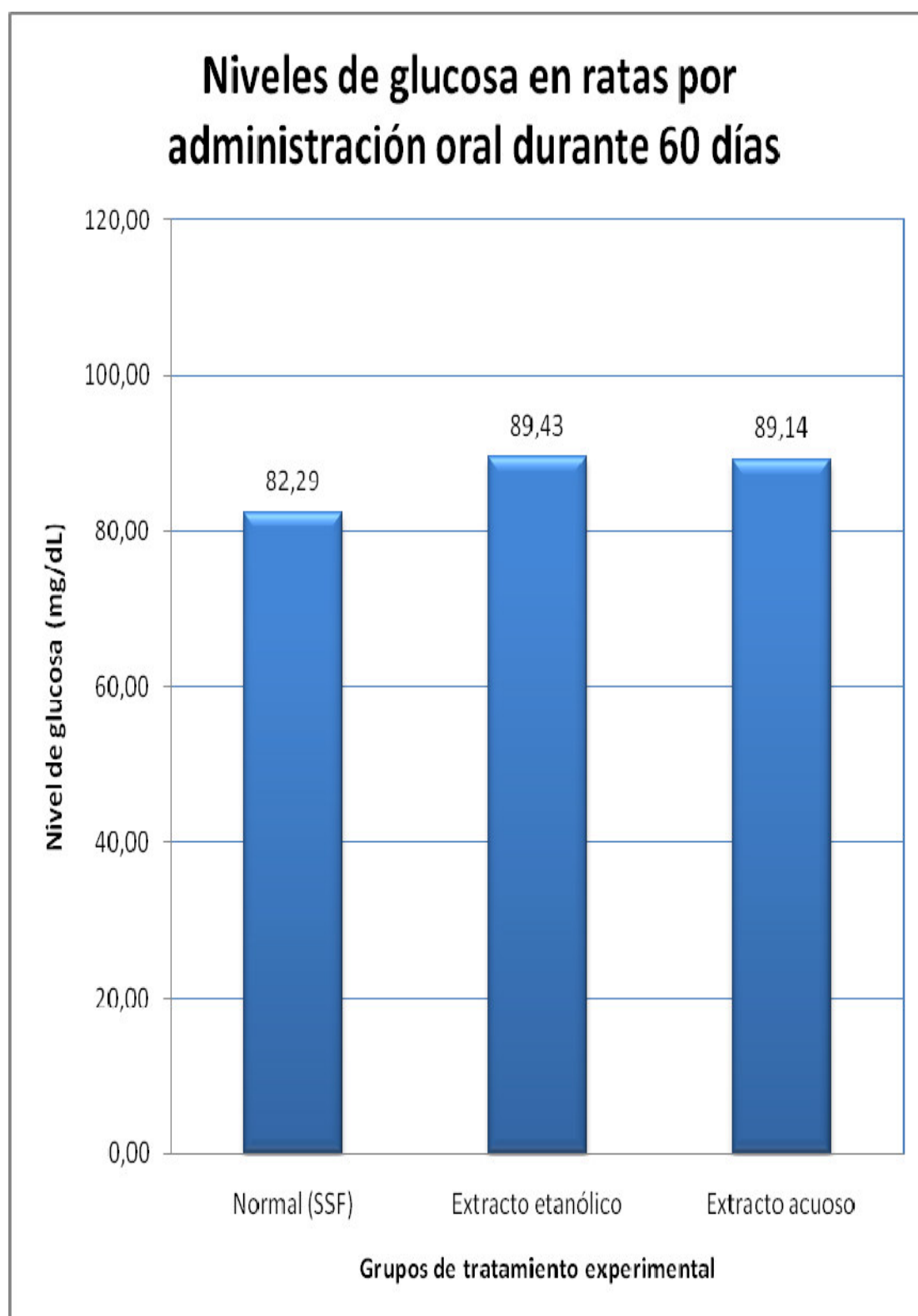


GRÁFICO N° 8. Niveles de glucosa en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de triglicéridos en ratas por administración oral durante 60 días

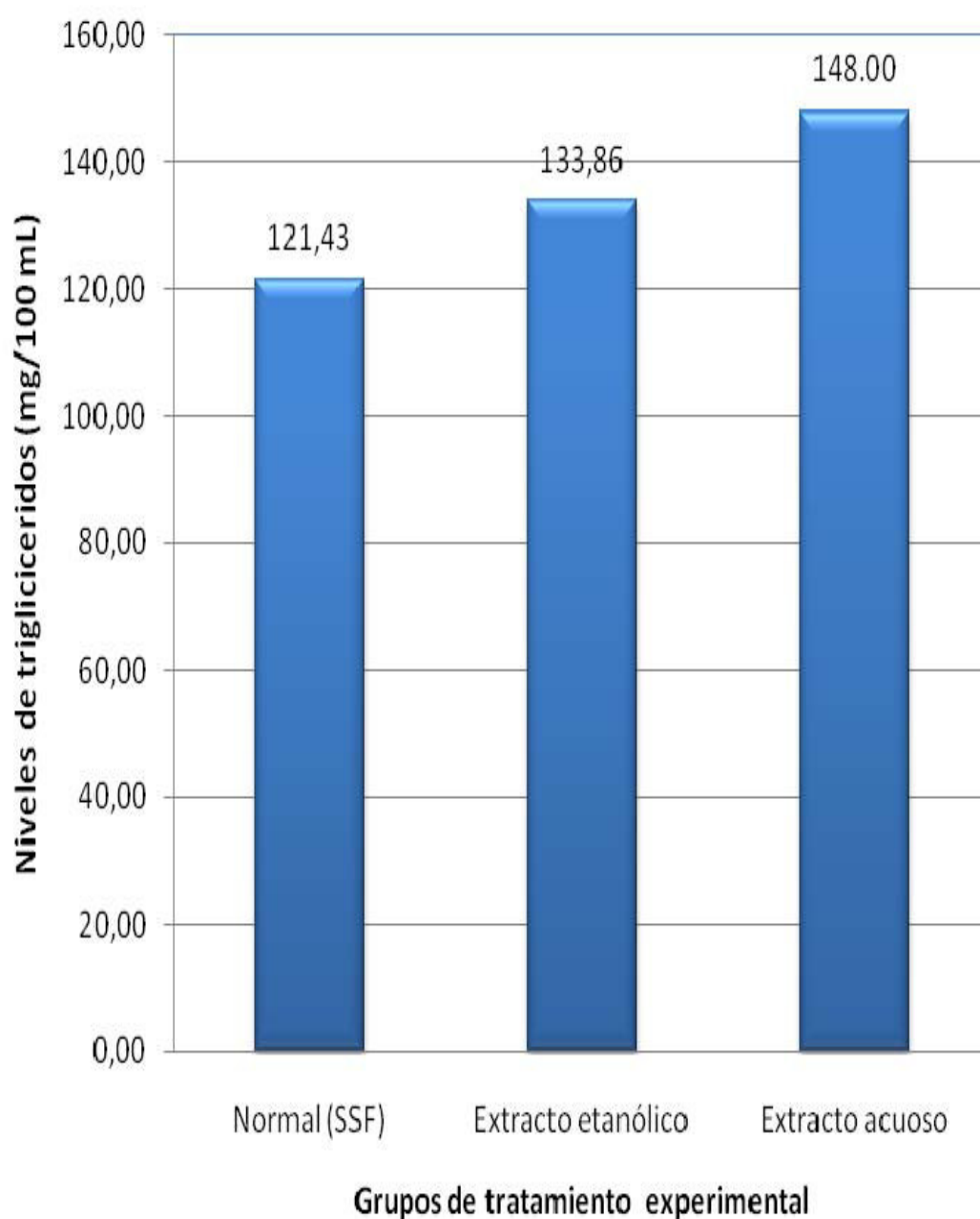


GRÁFICO N° 9. Niveles de triglicéridos en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de TGP en ratas por administración oral durante 60 días

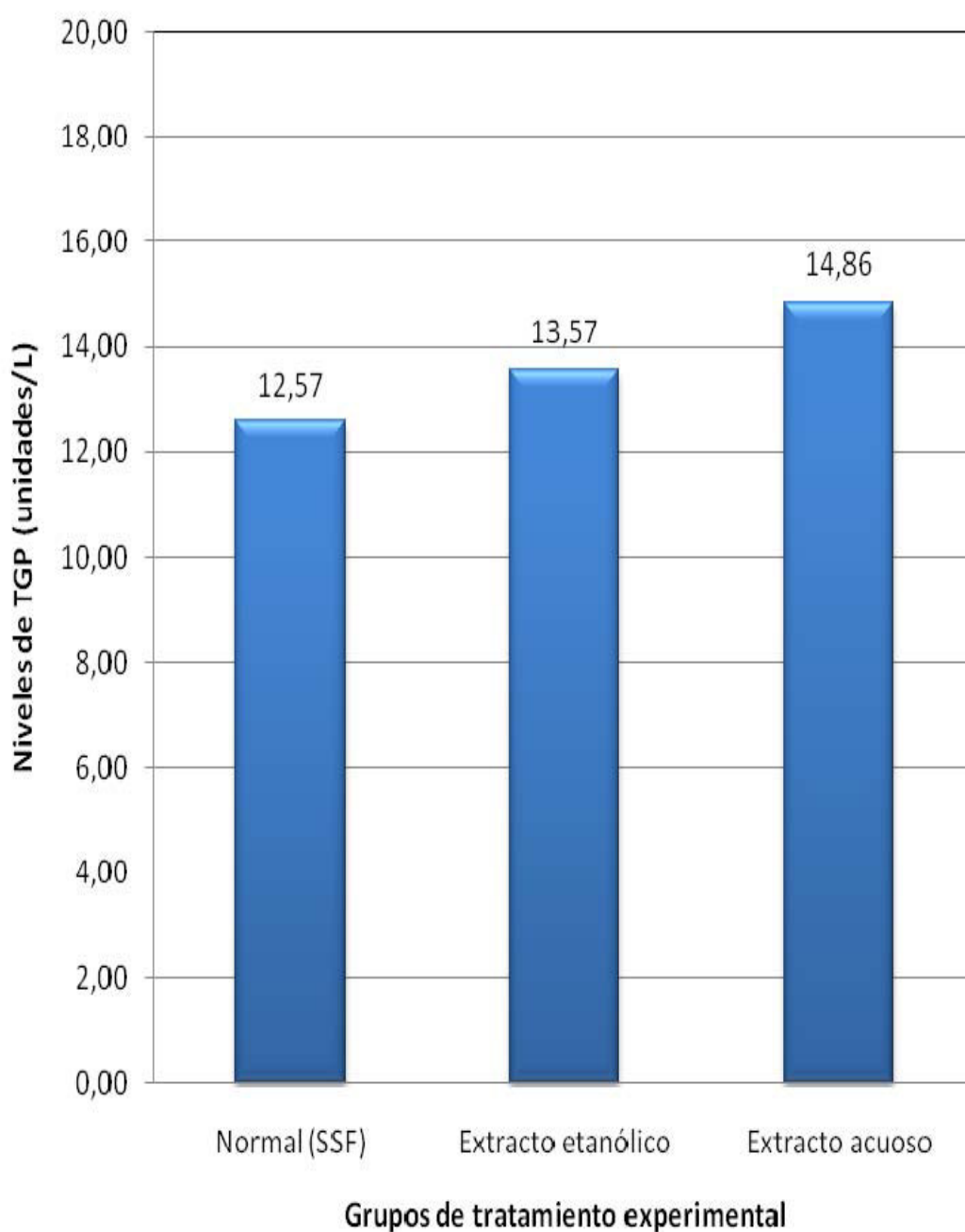


GRÁFICO N° 10. Niveles de TGP en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de urea en ratas por administración oral durante 60 días

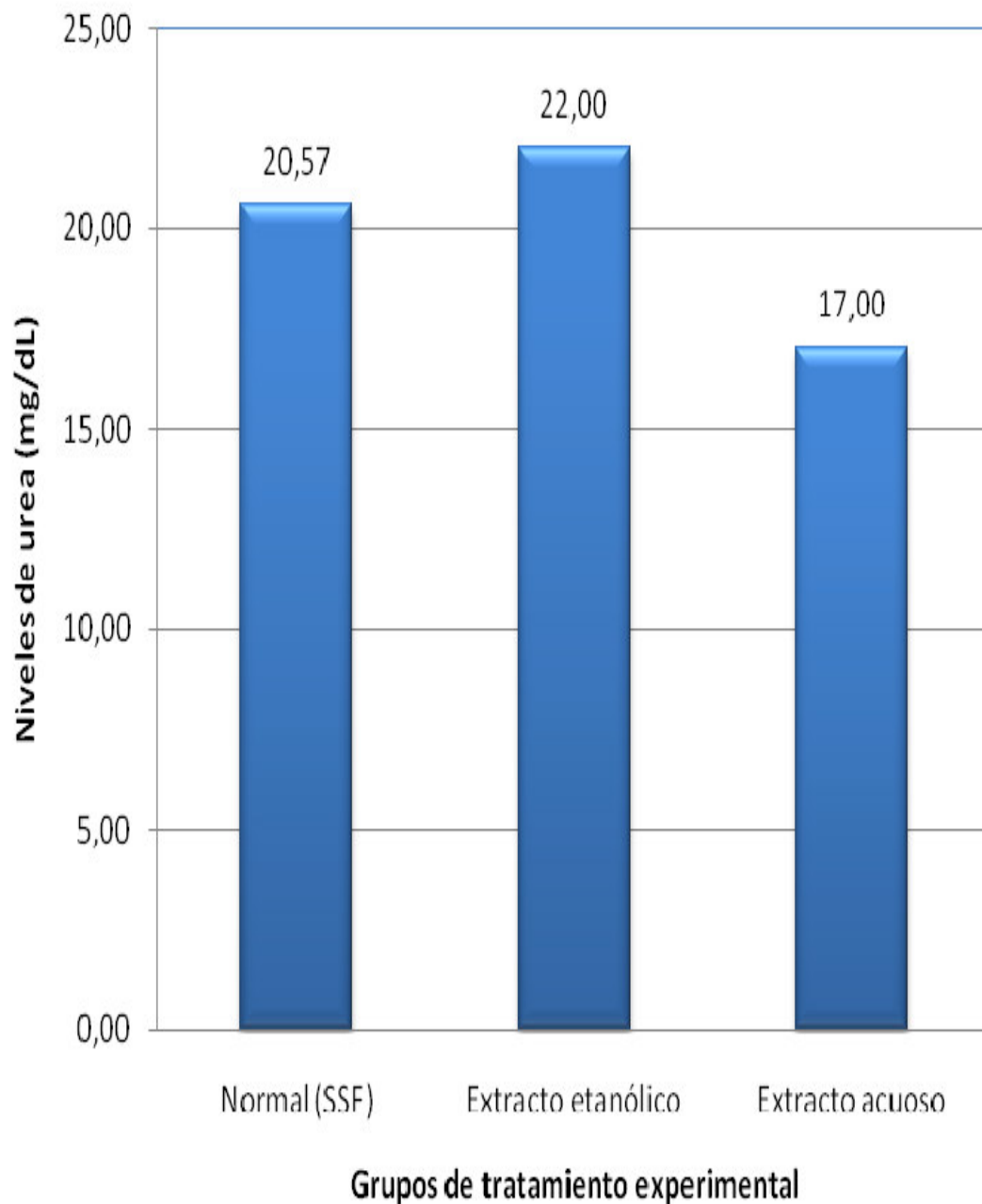


GRÁFICO N° 11. Niveles de urea en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

Niveles de fosfatasa alcalina en ratas por administración oral durante 60 días

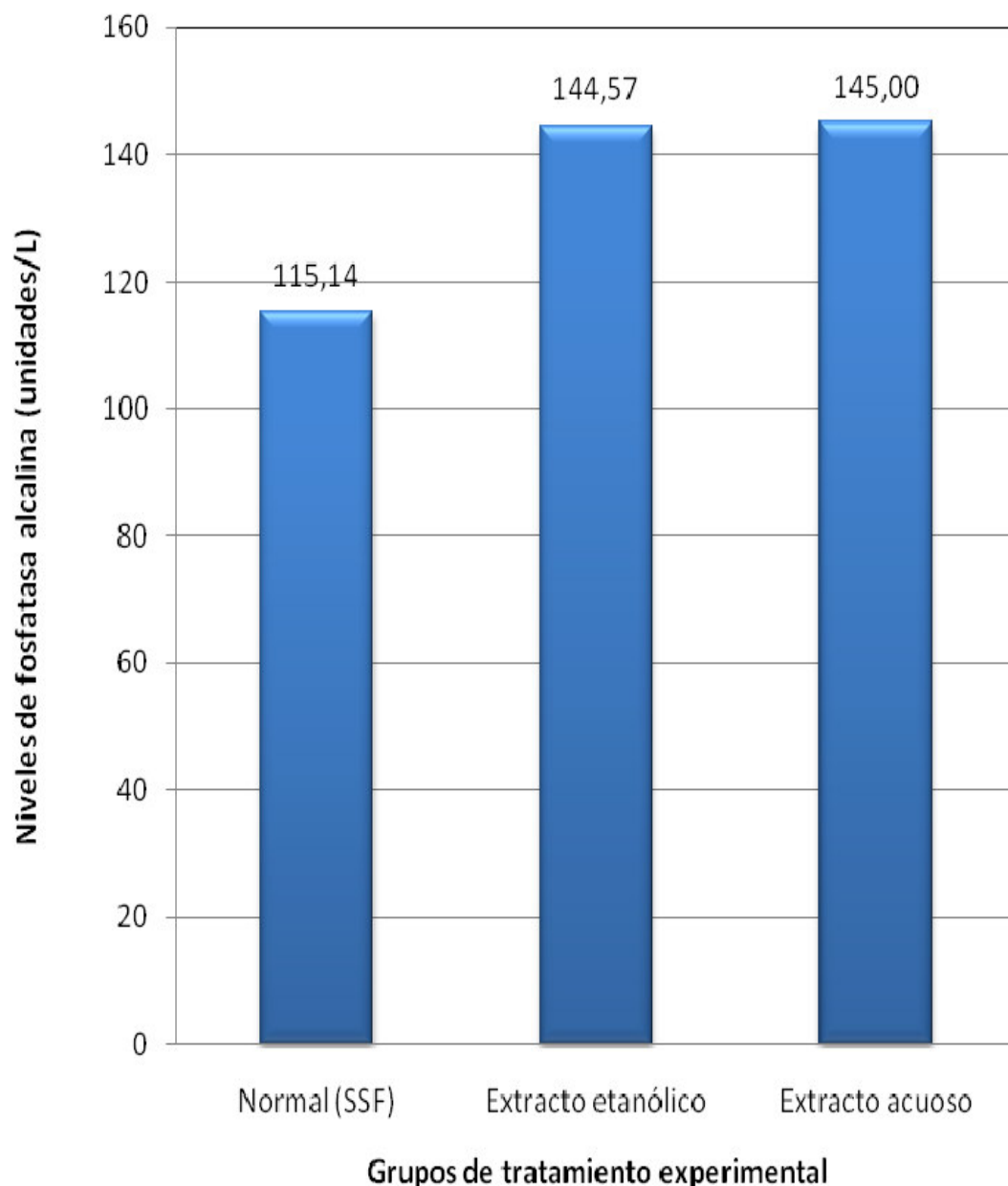


GRÁFICO N° 12. Niveles de fosfatasa alcalina en sangre de ratas, toxicidad a dosis repetidas de *Morinda citrifolia*.

CORAZÓN

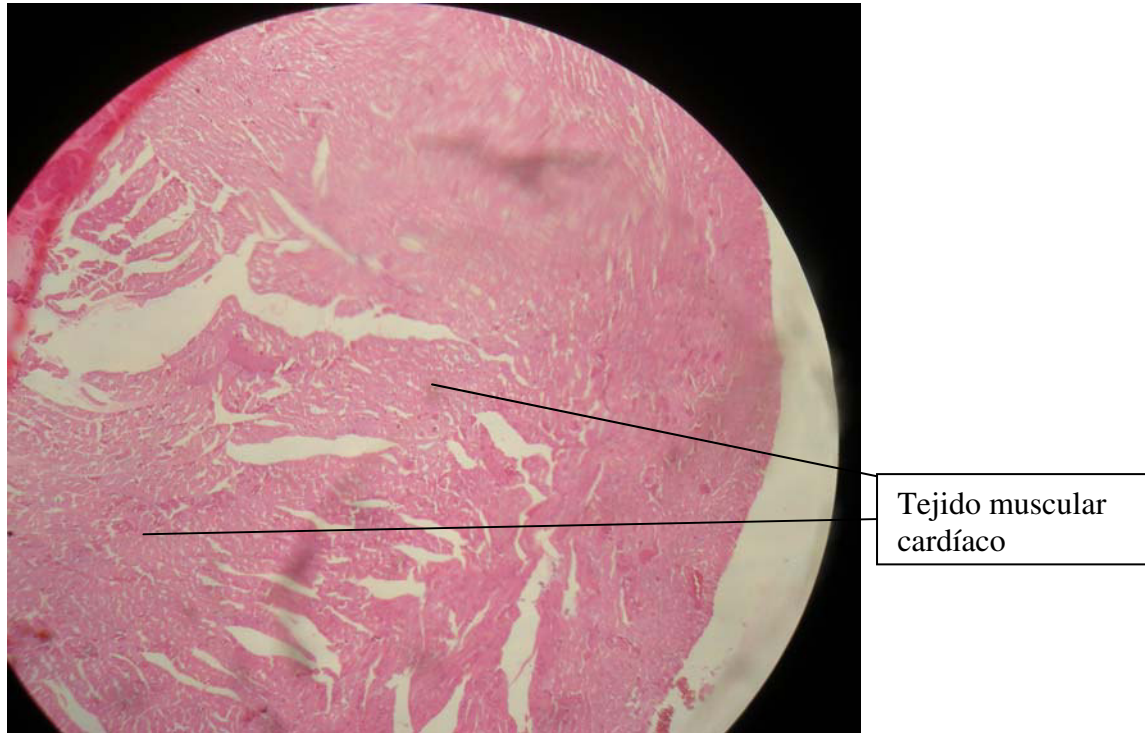


Figura N°10. Grupo control negativo. Corazón se observa tejido cardíaco en donde no hay alteraciones histomorfológicas. Observación a 40X.

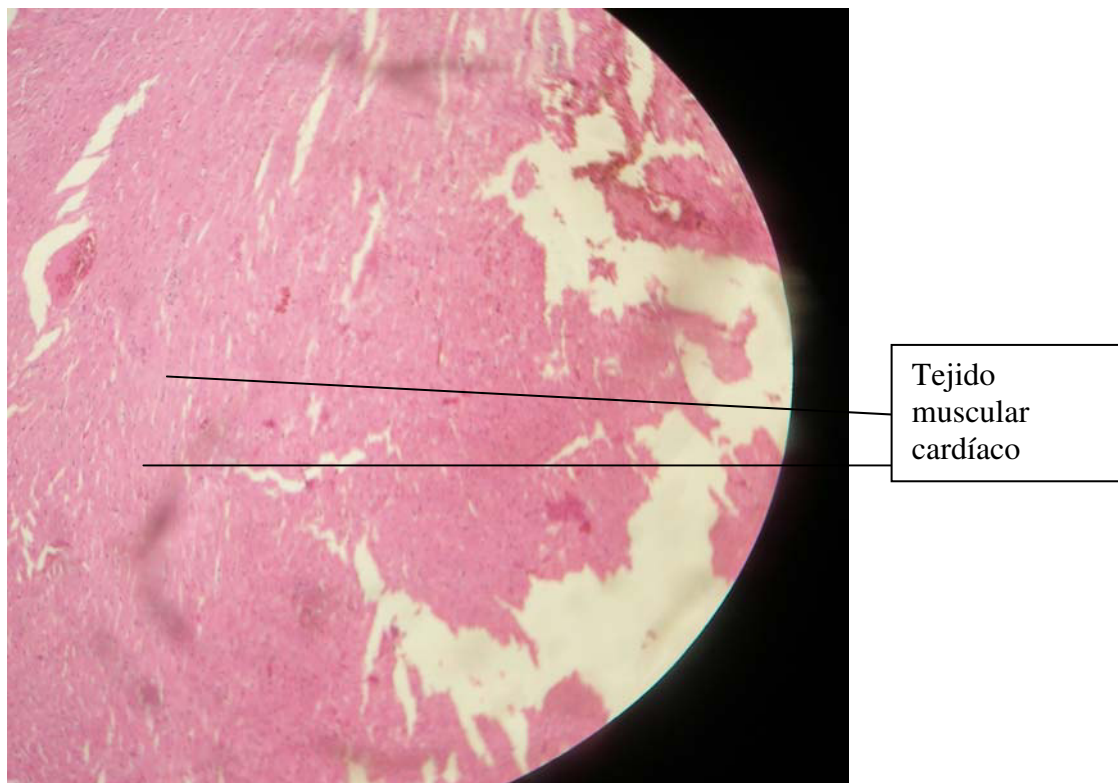


Figura N°11. Grupo extracto alcohólico. Corazón se observa tejido cardíaco en donde no hay alteraciones histomorfológicas. Observación a 40X.

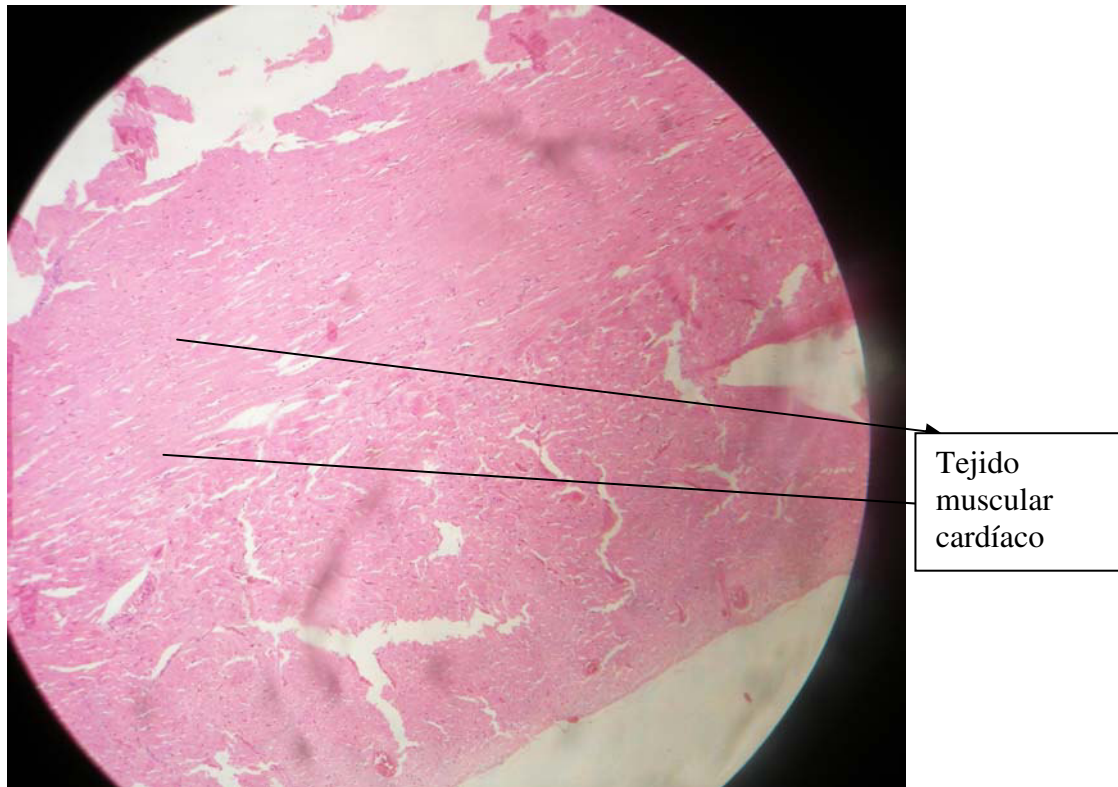


Figura N°12. Grupo extracto acuoso. Se observa tejido cardíaco en donde no hay alteraciones histomorfológicas. Observación a 40X.

PULMÓN

(Todas las presentaciones son con coloración hematoxilina-esosina)

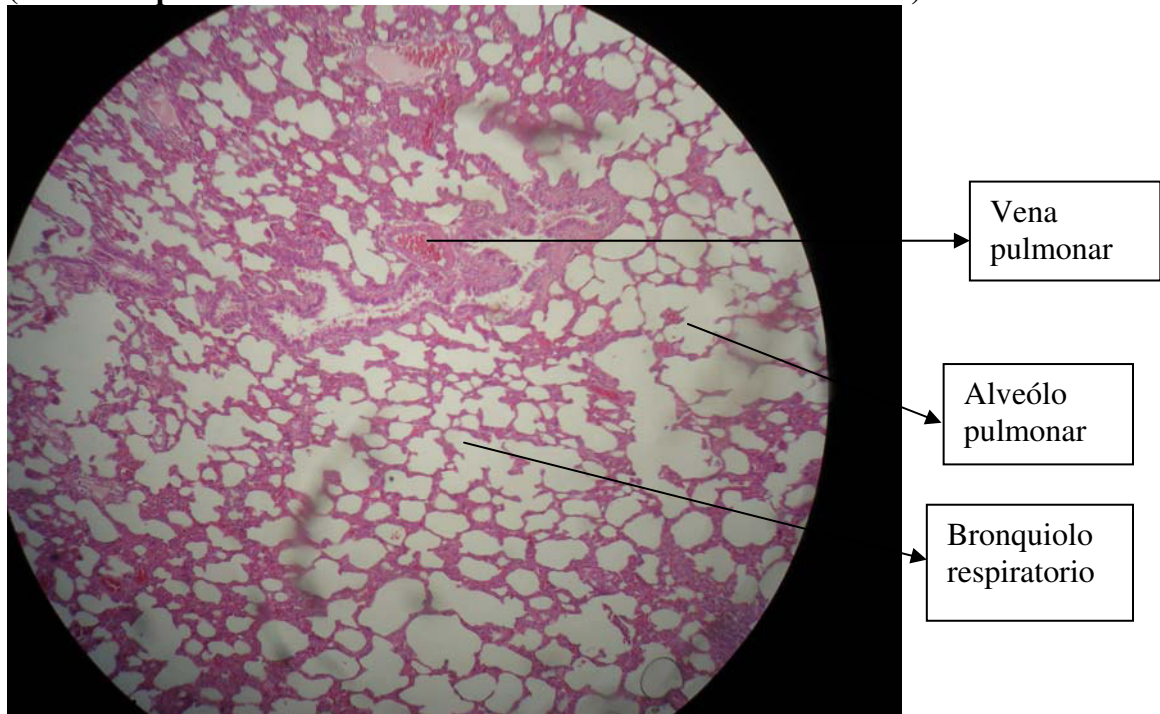


Figura N°13. Grupo control negativo. Se observa tejido pulmonar caracterizado por la presencia de conductos rodeados de un parénquima esponjoso. Se aprecia la vena, alveólos y bronquiolos de aspecto normal. Observación a 40X.

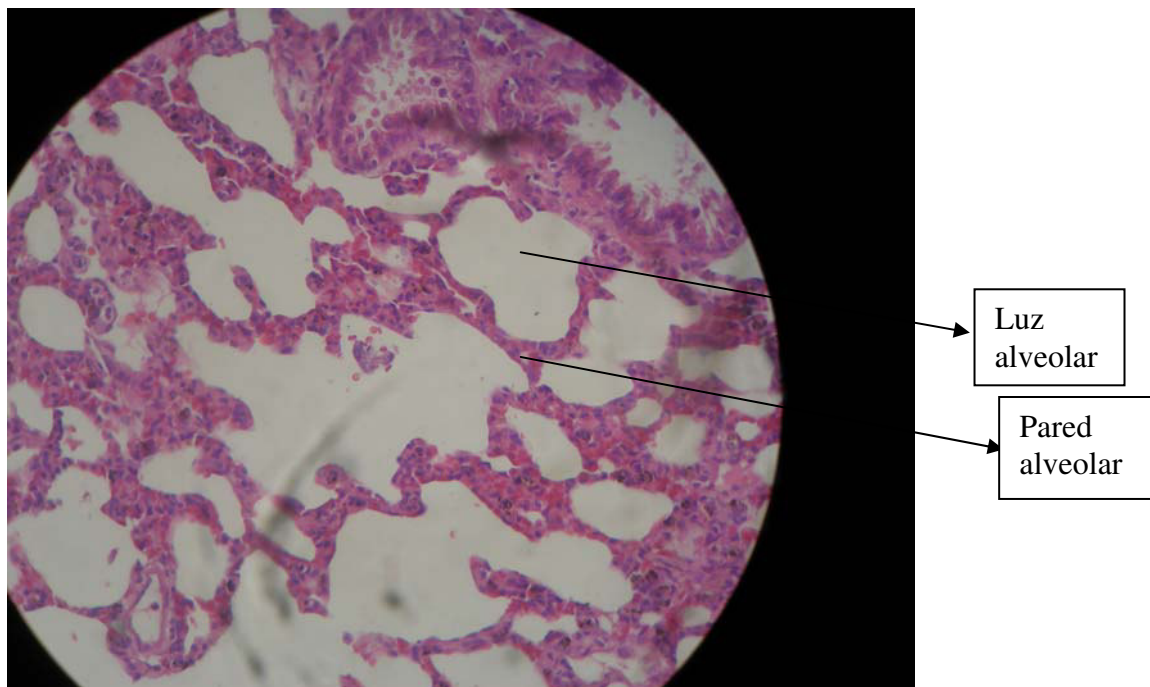


Figura N°14. Grupo extracto etanólico Se observa alveolos respiratorios donde observamos la luz y pared alveolar. También se observa capilares sanguíneos y células epiteliales de aspecto normal. Observación a 100X.

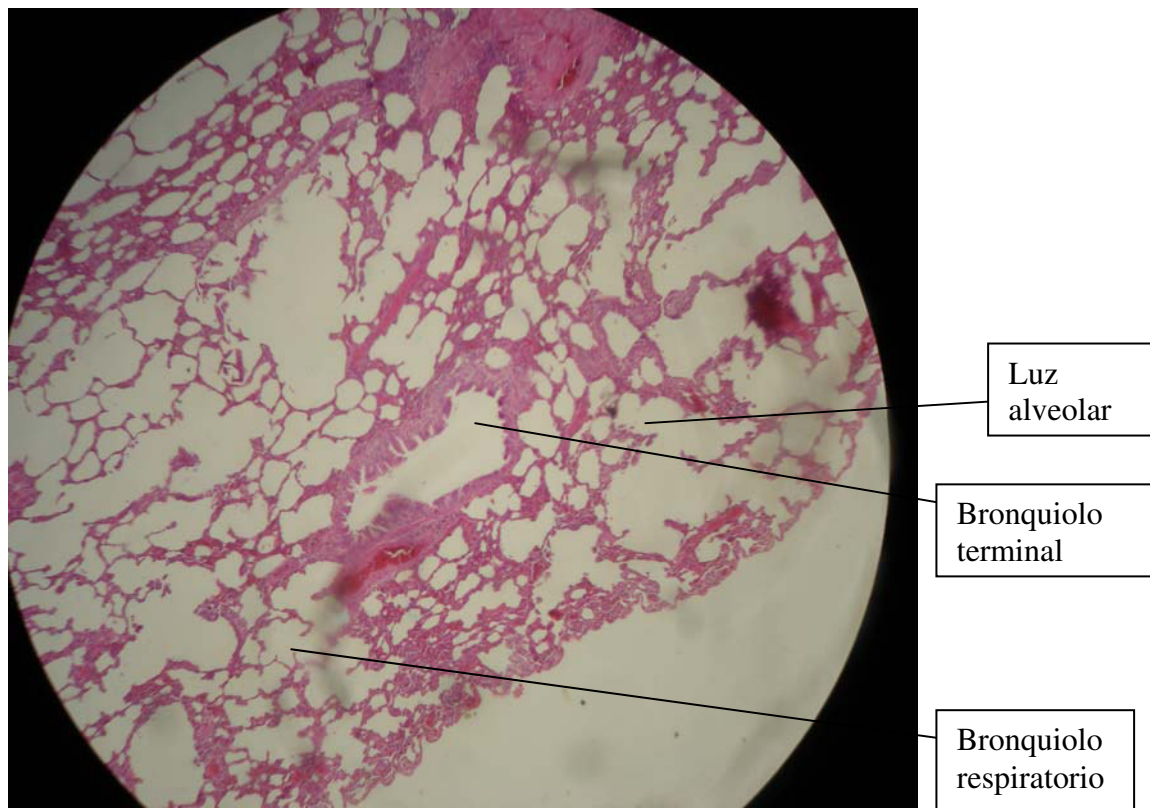


Figura N°15. Grupo extracto acuoso Se observa alveólos respiratorios donde observamos la luz y pared alveolar. También se observa capilares sanguíneos y células epiteliales de aspecto normal. Observación a 100X.

ESTÓMAGO

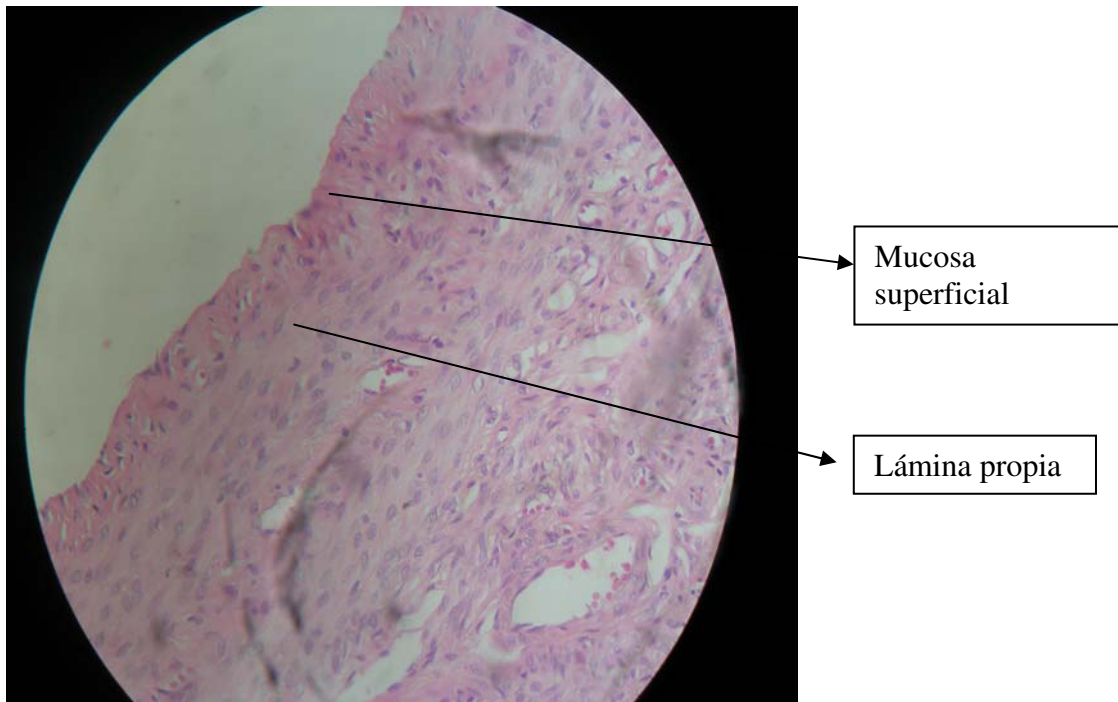


Figura N°16. Grupo control negativo. Se observa el estómago en sus capas donde no hay alteraciones. Observación a 40X.

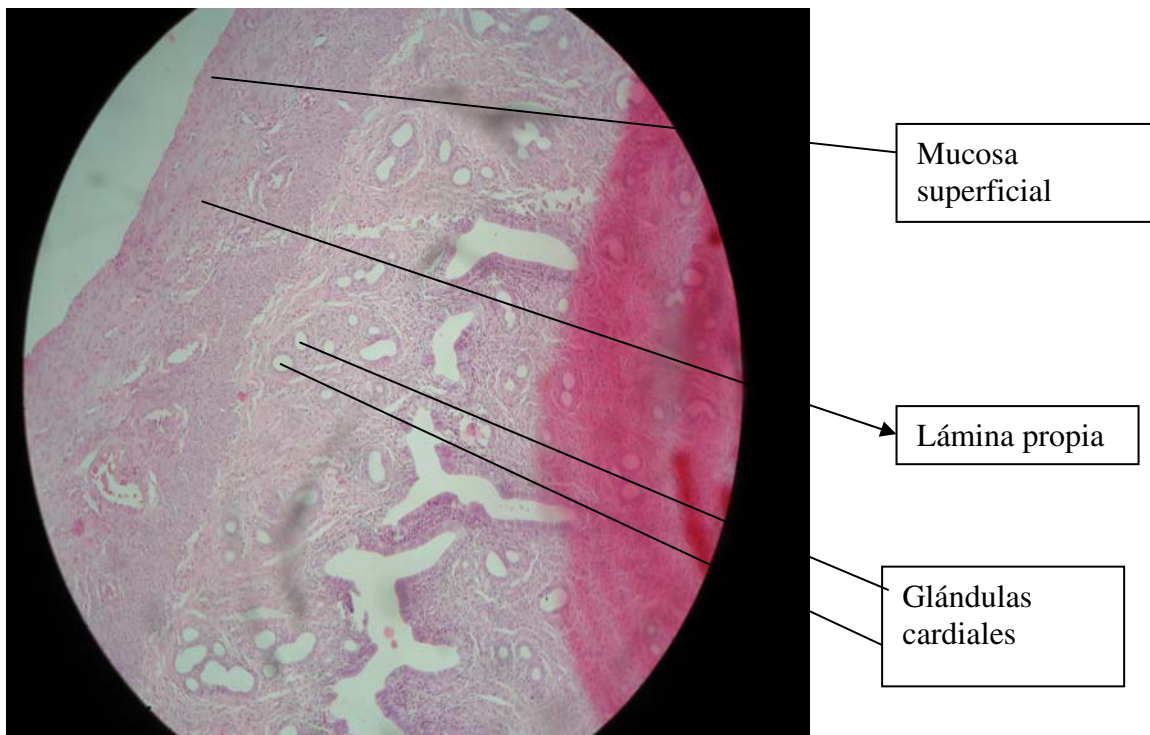


Figura N°17. Grupo extracto etanólico. Se observa el estómago en sus capas donde no hay alteraciones. Observación a 40X.

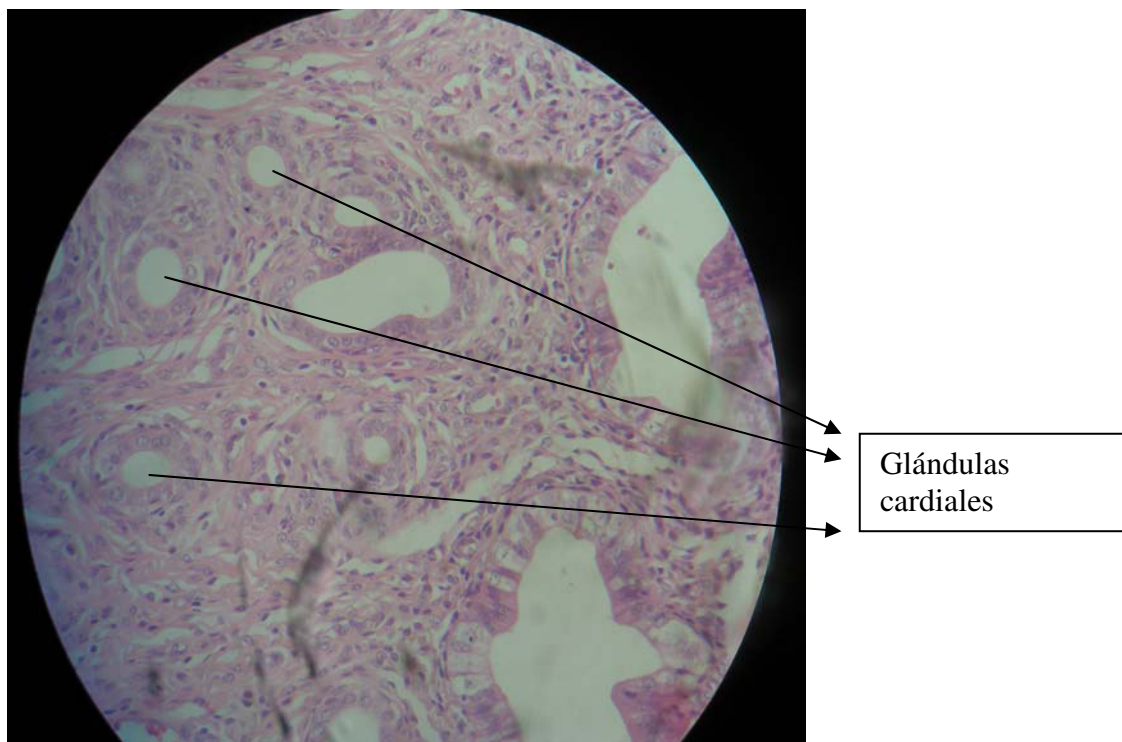


Figura N°18. Grupo extracto acuoso. Se observa el estómago en sus capas donde no hay alteraciones. Observación a 40X.

HÍGADO

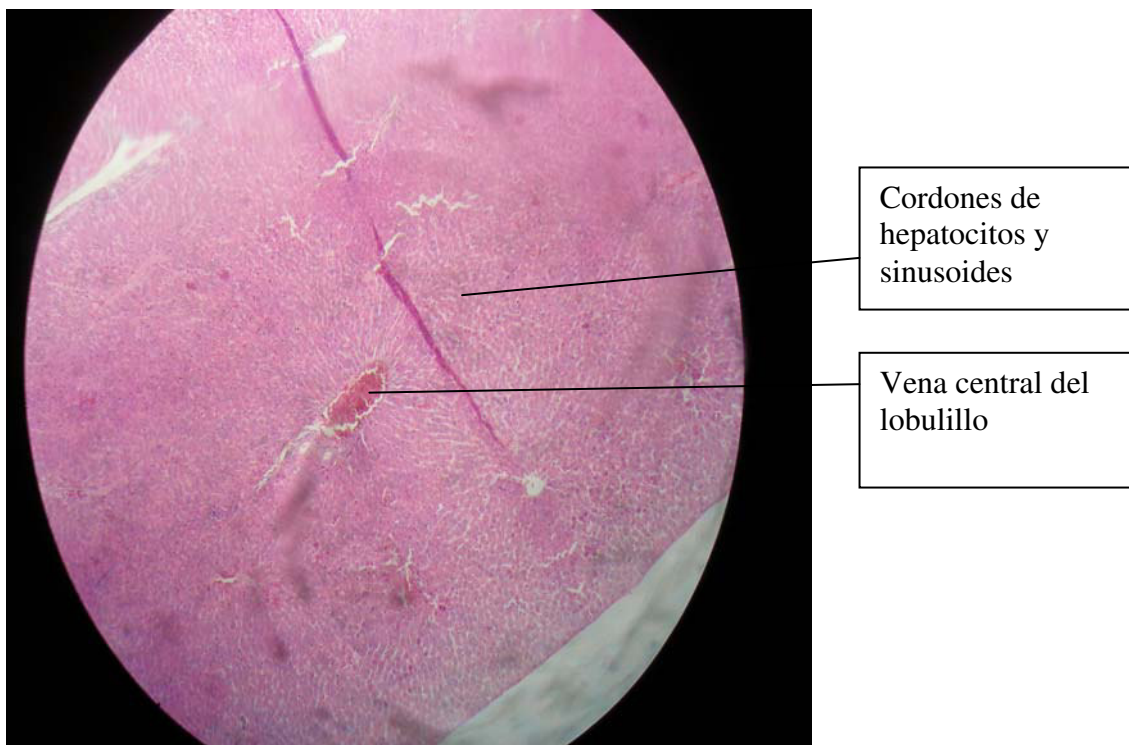


Figura N°19. Grupo control negativo. Se observa lo indicado en las flechas sin alteraciones histológicas. Observación a 10X.

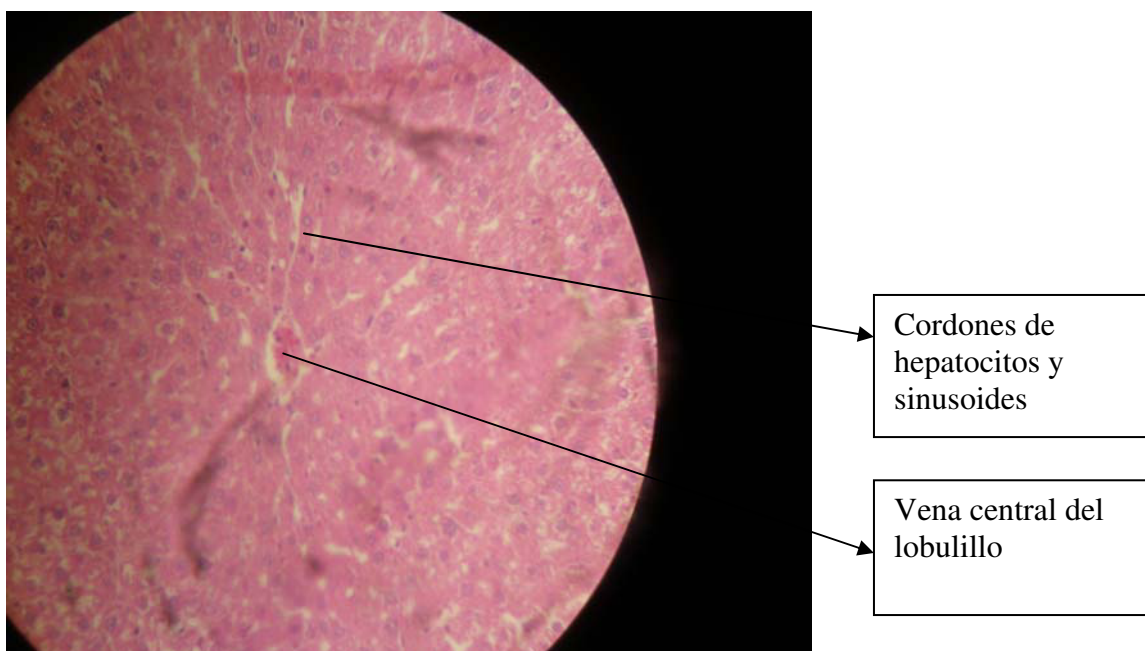


Figura N°20. Grupo extracto etanólico. Se observa lo indicado en las flechas sin alteraciones histológicas. Observación a 10X.

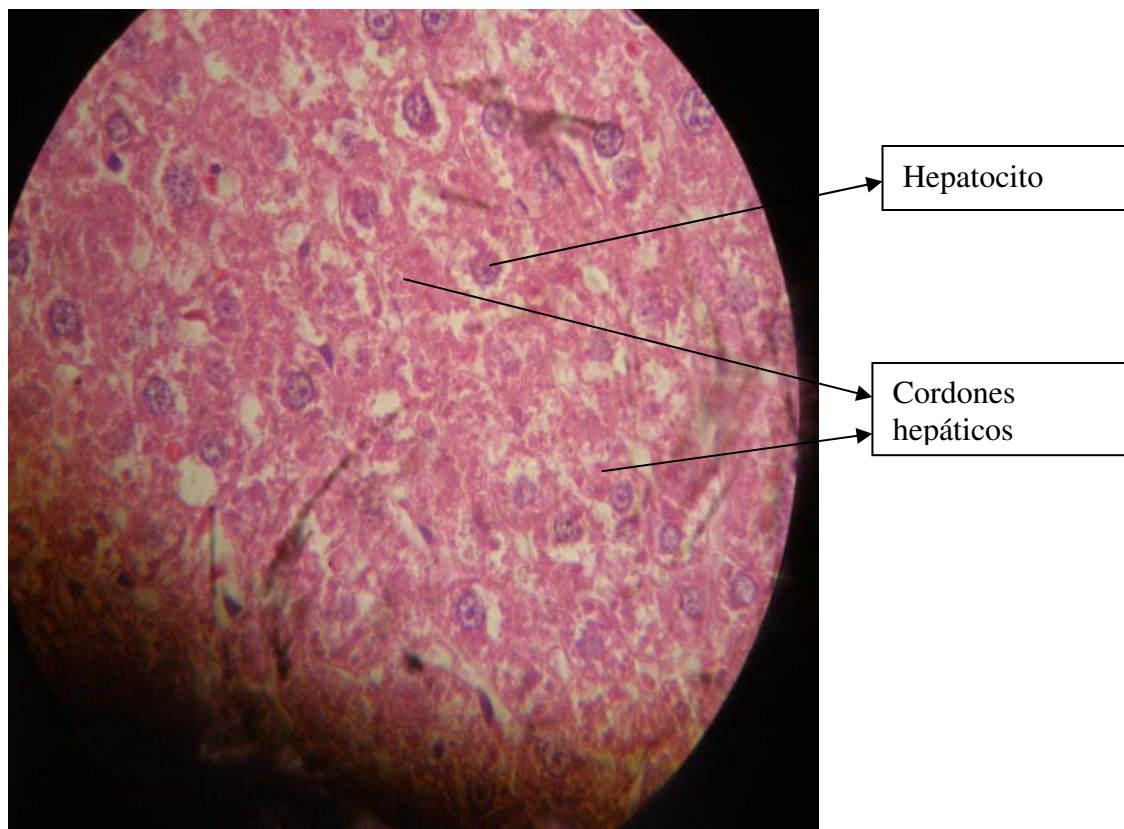


Figura N°21. Grupo extracto acuoso. Se observa lo indicado en las flechas sin alteraciones histológicas. Observación a 100X.

RIÑÓN

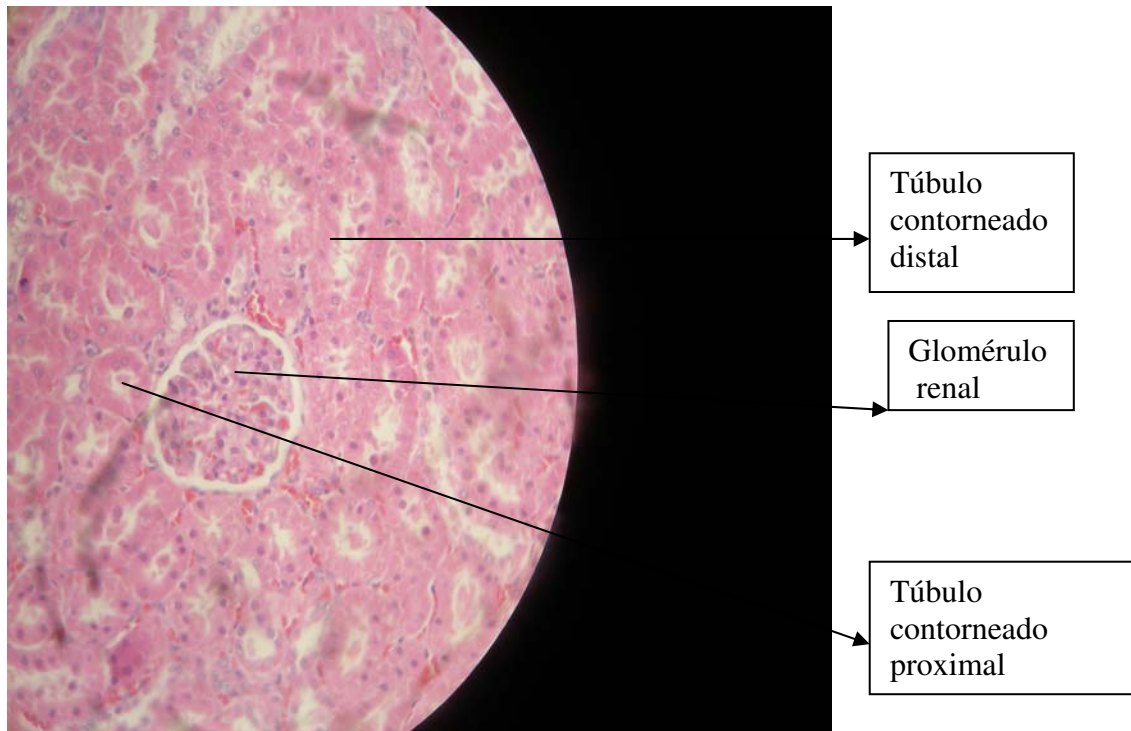


Figura N°22. Grupo control negativo. Se observa lo indicado en las flechas sin alteraciones histológicas. Observación a 40X.

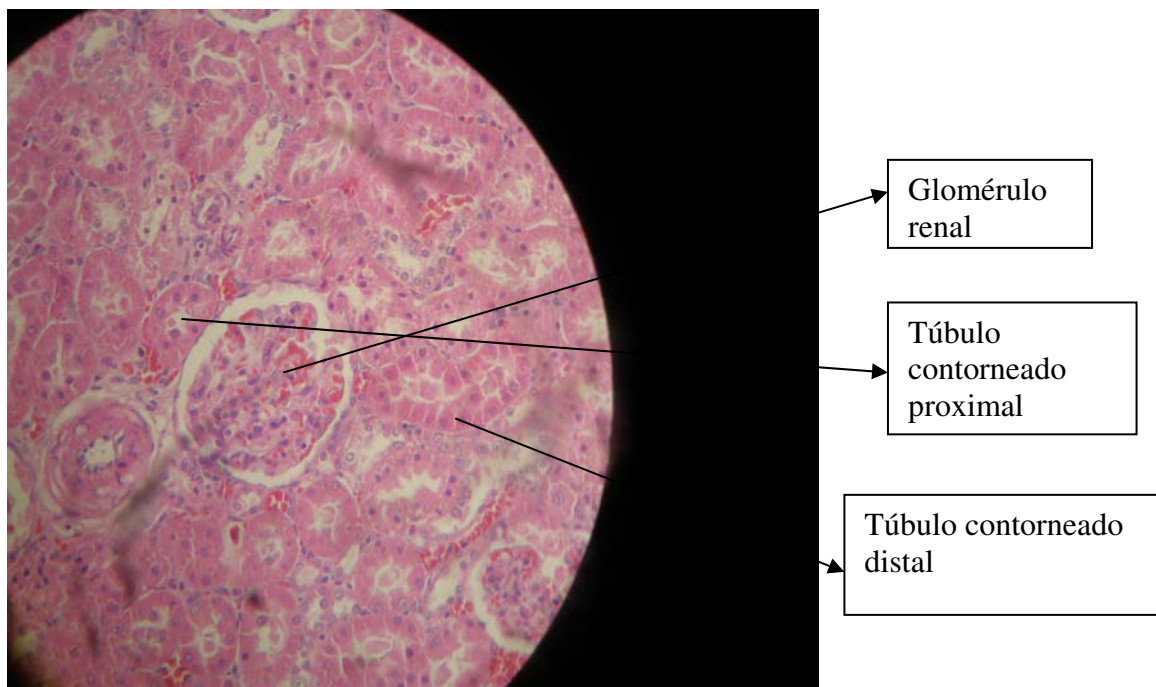


Figura N°23. Grupo extracto etanólico. Se observa lo indicado en las flechas sin alteraciones histológicas. Observación a 40X.

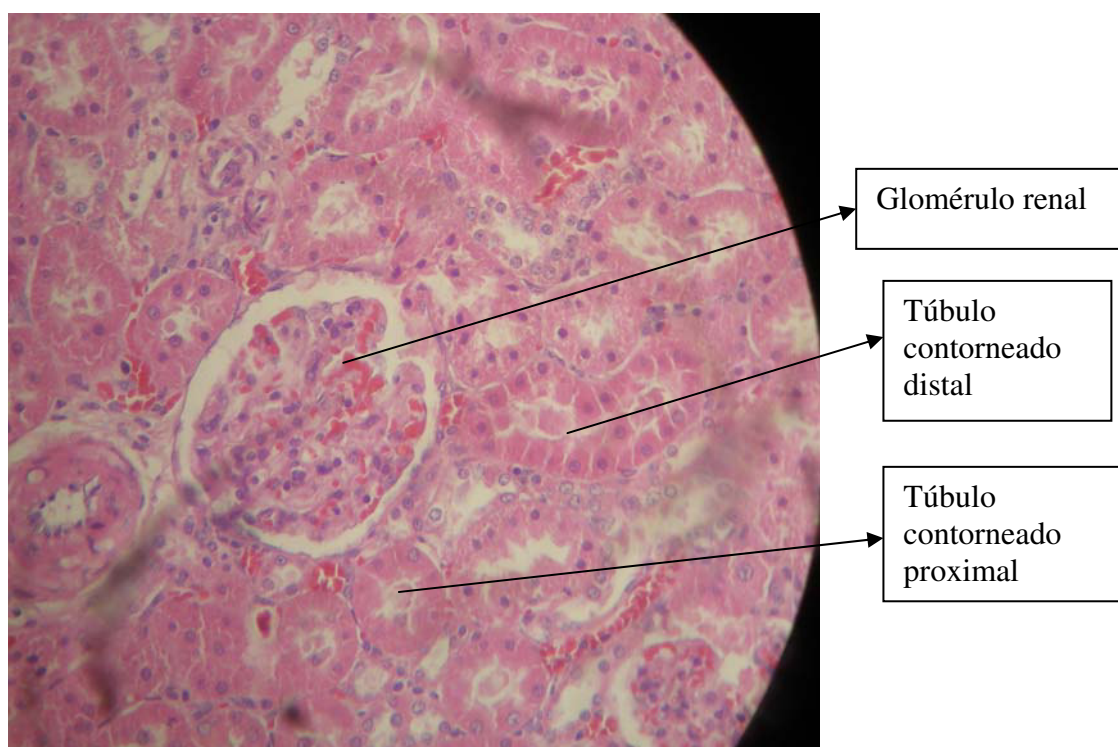


Figura N°24. Grupo extracto acuoso. Se observa lo indicado en las flechas sin alteraciones histológicas. Observación a 40X.

3.3 . EVALUACIÓN CITOTÓXICA

Tabla N°8. Resultados de los extractos de *Morinda citrifolia*, sometidos al bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizos de mar a las 24 horas de tratamiento.

ADMINISTRACIÓN	CONCENTRACIÓN	RESULTADOS
EXTRACTO ETANÓLICO	0,4mg/mL	+ (*)
	0,2mg/mL	+
	0,1mg/mL	v (g)
EXTRACTO ACUOSO	0,4mg/mL	+ (*)
	0,2mg/mL	v (b/g)
	0,1mg/mL	v (b/g)
CONTROL	-	v (g)

Nota: **v** = vivos, **+** = muertos, **g** = gástrula, **b** = blástula, **g/b** = mayor % de gástrula, **b/g** = mayor % de blástula. (Estadios embrionarios, referencia fig. N° 3.)
 (*)= Cambios en la coloración del núcleo

Tabla N°9. Resultados de los extractos de *Morinda citrifolia*, sometidos al bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizos de mar a las 48 horas de tratamiento.

ADMINISTRACIÓN	CONCENTRACIÓN	RESULTADOS
EXTRACTO ETANÓLICO	0,4mg/mL	+
	0,2mg/mL	+
	0,1mg/mL	v (p)
EXTRACTO ACUOSO	0,4mg/mL	+
	0,2mg/mL	+
	0,1mg/mL	+
CONTROL	-	v (p)

Nota: **v** = vivo, **+** = muertos, **p** = pluteus

Gástrula, blástula, pluteus (Estadios embrionarios, referencia figura N° 3.)

Tabla N°10. Resultados de la actividad citotóxica de las extractos obtenidos a partir del fruto de *Morinda citrifolia* sobre embriones de erizos de mar

ADMINISTRACIÓN	CONCENTRACIÓN	% ctx. 24horas	% ctx. 48horas	ACTIVIDAD (*)
EXTRACTO ETANÓLICO	0,4mg/mL	100,00%	100,00%	fuerte
	0,2mg/mL	100,00%	100,00%	fuerte
	0,1mg/mL	98,00%	98,00%	fuerte
EXTRACTO ACUOSO	0,4mg/mL	100,00%	100,00%	fuerte
	0,2mg/mL	87,00%	100,00%	fuerte
	0,1mg/mL	75,00%	100,00%	moderada
CONTROL	-	0,00%	1,00%	No hay actividad

	% V. C 24 horas	% V. C 48 horas
CONTROL	100%	99%

% Citotoxicidad (ctx) = muerte celular

% V. C = Porcentaje de viabilidad celular (células vivas)

(*) Para medir el nivel de actividad de los extractos de *Morinda citrifolia* se usan las siguientes categorías de inhibición, según Hose [45].

81-100%: ACTIVIDAD FUERTE

61-80%: ACTIVIDAD MODERADA

21-60%: ACTIVIDAD MEDIA

2-20%: ACTIVIDAD BAJA

0-1%: NO HAY ACTIVIDAD

Tabla N°11. Estado de desarrollo embrionario alcanzado por las células viables de erizos de mar a las 24 y 48 horas de tratamiento.

ADMINISTRACIÓN	CONCENTRACIÓN	EDCV	EDCV
		24horas	48horas
EXTRACTO ETANÓLICO	0,4mg/mL	-	-
	0,2mg/mL	-	-
	0,1mg/mL	g	p
EXTRACTO ACUOSO	0,4mg/mL	-	-
	0,2mg/mL	b/g	-
	0,1mg/mL	b/g	-
CONTROL	-	mayor g/b	mayor p/g

	%V.C	%V. C
	24 horas	48 horas
CONTROL	mayor g/b	mayor p/b

EDCV = estado de desarrollo alcanzado por las células vivas.

%V.C. = % de viabilidad celular

b/g = mayor % de blástula

g/b = mayor % de gástrula

p/b = mayor % pluteus.

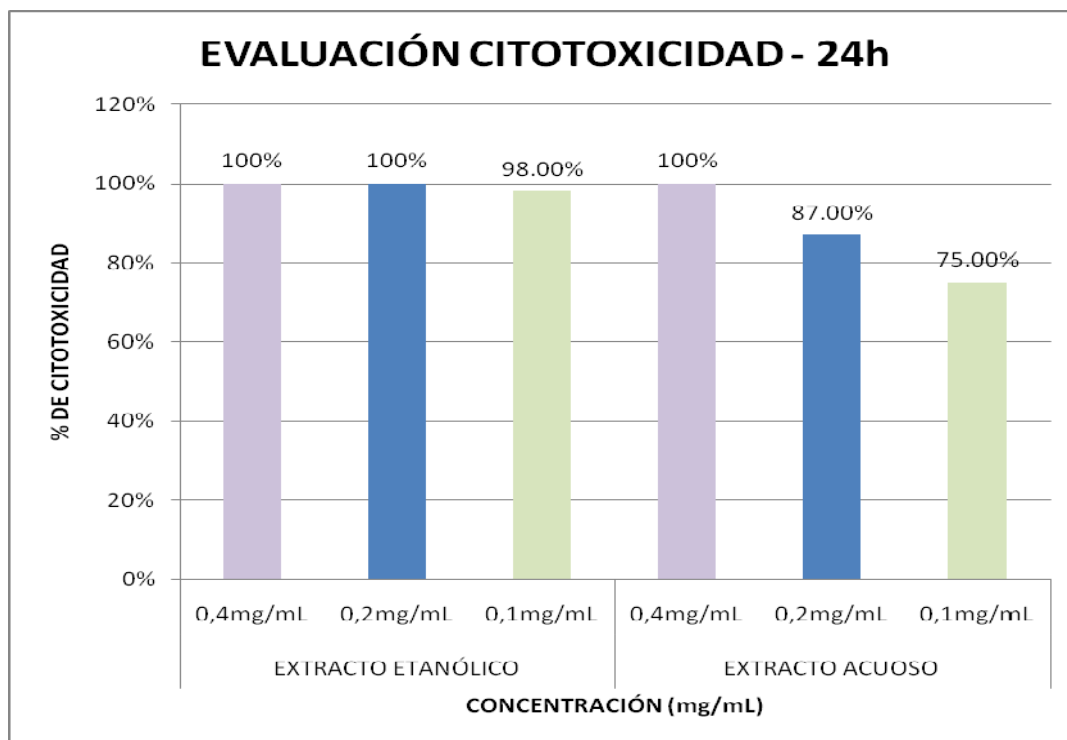


GRÁFICO N° 12. Actividad citotóxica de los extractos del fruto de *Morinda citrifolia* a las 24 horas de prueba.

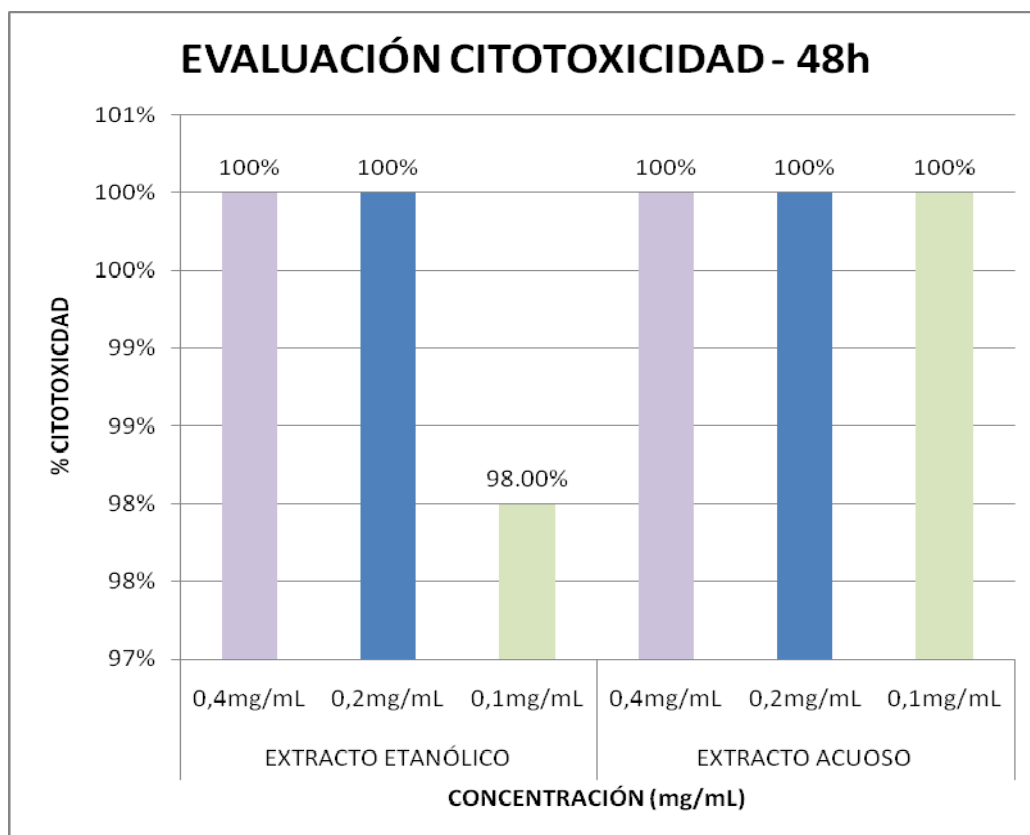


GRÁFICO N° 13. Actividad citotóxica de los extractos del fruto de *Morinda citrifolia* a las 48 horas de prueba.

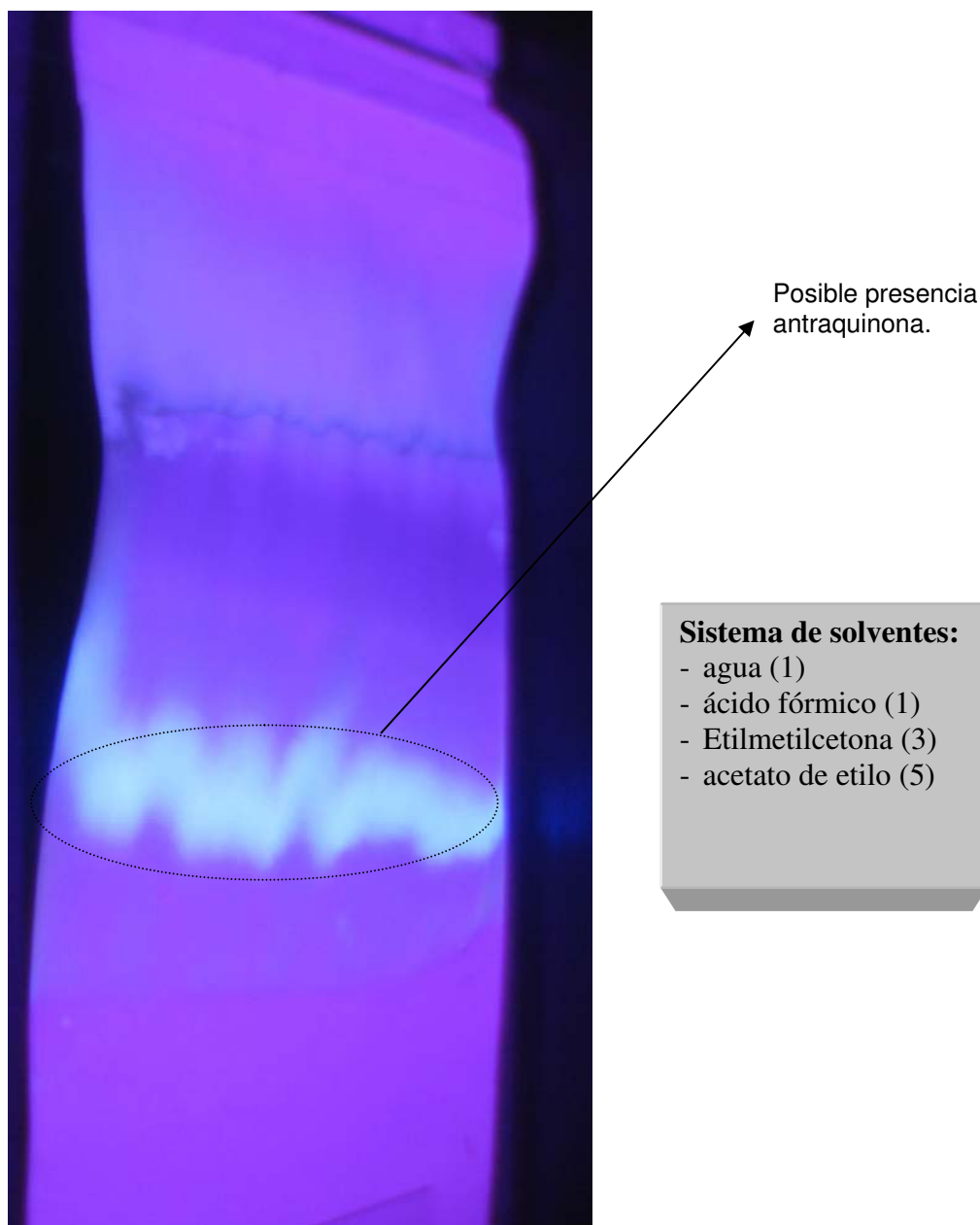


Figura N° 25. Cromatograma del extracto etanólico del fruto de *Morinda citrifolia*.

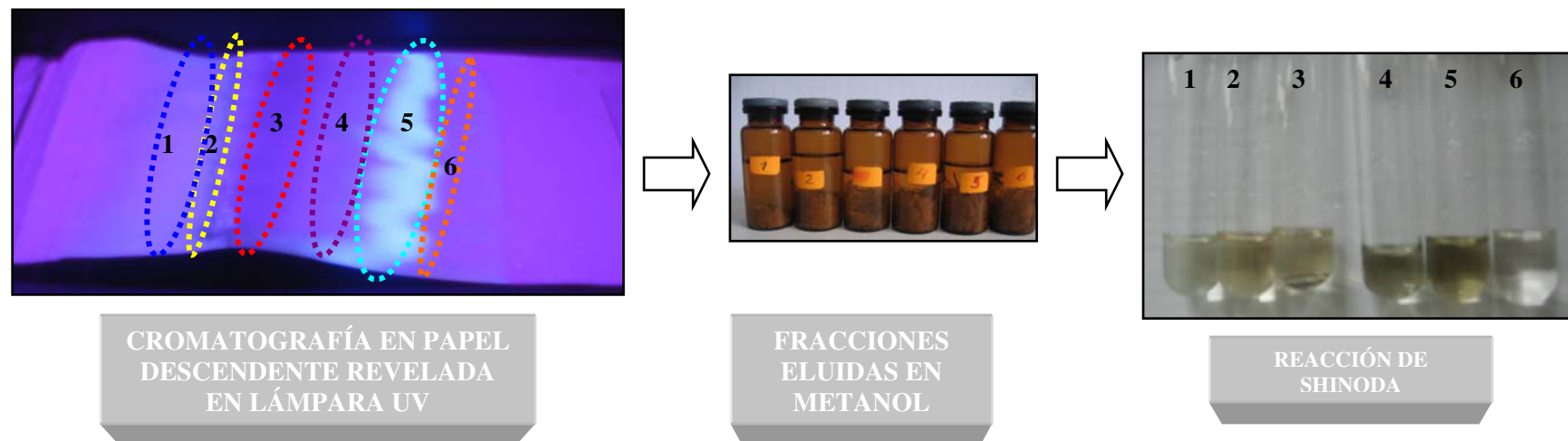


Figura N° 26. Reacciones de determinación de antraquinonas y flavonoides

Tabla N° 12. Resultados de reacción de Shinoda y Bornträger

	REACCIÓN SHINODA	REACCIÓN BORNTRÄGER
TUBO 1	-	-
TUBO 2	++	-
TUBO 3	+	-
TUBO 4	++	-
TUBO 5	+++	+++
TUBO 6	-	-

TUBO 1: FRACCIÓN ELUIDA 1
TUBO 2: FRACCIÓN ELUIDA 2
TUBO 3: FRACCIÓN ELUIDA 3
TUBO 4: FRACCIÓN ELUIDA 4
TUBO 5: FRACCIÓN ELUIDA 5
TUBO 6: FRACCIÓN ELUIDA 6

Leyenda: Donde (-) = **negativo**;
(+) = **ligera presencia**;
(++) = **moderada presencia**;
(+++) = **fuerte presencia**

IV. DISCUSIÓN

Los estudios toxicológicos preclínicos deben ofrecer la mayor evidencia experimental posible, esclarecer órganos diana, definir los niveles de exposición a partir de los cuales aparecen efectos tóxicos, o establecer el mayor nivel de dosis al cual no se producen efectos adversos, con el objetivo de extrapolar los resultados al ser humano, teniendo en cuenta las diferencias cualitativas y cuantitativas entre especies, así como la imposibilidad de detectar ciertas formas de toxicidad, como las relacionadas con reacciones alérgicas e idiosincráticas [50].

Una evaluación toxicológica integral, donde tanto los métodos de experimentación animal más convencionales y bien conocidos como los nuevos métodos alternativos permanezcan en armónica integración, permitirá ofrecer un mayor y más confiable margen de seguridad para reducir al mínimo el riesgo potencial y con la mayor certeza posible [50].

4.1. Genotoxicidad

El presente estudio se ha centrado en evaluar la ausencia de efecto genotóxico del extracto de *Morinda citrifolia*, lo cual se ve reflejado en los resultados. No se observó genotoxicidad en sangre periférica de ratones, al administrar el extracto acuoso y etanólico de *Morinda citrifolia*, los valores del índice de genotoxicidad obtenidos van desde 0,4-0,9 mientras que el control positivo dio un valor de 3,9 (**Tabla N°3, gráfico N°1**), lo que indica que ninguna de las concentraciones administradas de los extractos evaluados afecta genotóxicamente a la sangre periférica, debido a que no hay incrementos significativos en la frecuencia de micronúcleos. Los valores obtenidos de 0,4-0,9 se pueden deber a la presencia en el fruto de antraquinonas que están relacionadas con el potencial genotóxico, entre las antraquinonas a las que se le relaciona el potencial genotóxico tenemos a rubiadina y lucidina [61].

4.2. Ensayo de Toxicidad a Dosis Repetidas

En el estudio de toxicidad a dosis repetidas en ratas, los exámenes hematológicos y bioquímicos son de gran valor en los ensayos toxicológicos a largo

plazo ya que los mismos son indicativos del alcance y profundidad de un daño, además los resultados alcanzados pueden correlacionarse con los posibles daños sobre un órgano específico.

Existió una reducción sostenida en el tiempo del peso corporal en los grupos tratados con los extractos en comparación con el grupo control (Tabla N°5, gráfico N°2), a medida que transcurrieron los días del ensayo la diferencia fue marcada a partir de la cuarta semana de tratamiento, si bien un descenso del peso corporal se podría tomar como un indicador de daño toxicológico, pero en nuestro ensayo no se dio debido a que la disminución se sostuvo en el tiempo y no fue un cambio abrupto además se confirmó por que se observó variaciones en los parámetros hematológicos, bioquímicos ni histológicos [62].

En el caso de los parámetros hematológicos (**Tabla N°6**), la hemoglobina difiere en los grupos tratados del grupo control pero estos valores se encuentran dentro del rango normal. En caso de los valores de leucocitos totales pudimos observar que el grupo tratado con el extracto acuoso presentó valores por debajo del grupo control pero que se encontraban dentro del rango normal mientras que para el caso del extracto etanólico se evidenció un incremento del número de leucocitos, con lo cual podríamos inducir que nuestra planta en estudio contiene principios activos inmunoestimulantes, en el caso de los ratones pudimos observar también un incremento del número de monocitos, lo cual también fue reportado en otros estudios [53]. Un aumento del recuento leucocitario, a expensas de linfocitos, monocitos y eosinófilos, no puede tomarse por completo como una respuesta inmunoestimulante; sin embargo, sería necesario e importante explorar si esta acción podría deberse a componentes similares a lipopolisacáridos, a alquilamidas o polialquenos que se han encontrado con frecuencia en plantas medicinales antiinfecciosas y que activan la inflamación y actúan como un factor estimulante de colonias. De esta forma ejercerían una acción similar a la de las citoquinas hematopoyéticas y aumentarían en sangre periférica en los tres grupos celulares antes mencionadas [52,53].

En el caso de los parámetros bioquímicos (**Tabla N°7**) se pudo observar que se produjo una disminución de los niveles de colesterol tanto en el tratamiento con extracto acuoso como con el extracto etanólico, la reducción de los niveles de colesterol puede estar relacionada con la inhibición de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-Co A), que juega un papel clave en el control de los niveles de lípidos en el plasma y otros tejidos, tal como lo señalan otros estudios donde se evalúa el efecto del fruto de *Morinda citrifolia* en la obesidad [60]; así mismo, se observó un incremento de los niveles de HDL con respecto al grupo control, con lo cual se observa un gran potencial para estudios posteriores, relacionados con la obesidad. A nivel del parámetro de urea en sangre se observó que estaba dentro de los valores normales, este parámetro es utilizado para evaluar posible daño renal. Mientras que a nivel de los otros parámetros bioquímicos no se observó significancia patológica, dado que se encontraban dentro de los valores normales.

Los resultados obtenidos a nivel bioquímico y sanguíneo se constataron con el estudio histopatológico, con la no existencia de alteraciones tanto macroscópicas como microscópicas en ninguno de los órganos evaluados.

4.3. Ensayo de Citotoxicidad

En el ensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar se observó que los extractos presentan actividad citotóxica (**Tabla N°8**), el extracto etanólico y acuoso a la mayor concentración produjo cambios de coloración en la célula. También se observaron daños citológicos como pérdida de pigmentación de la célula.

Se determinó el porcentaje de citotoxicidad durante el desarrollo embrionario para las 3 concentraciones del extracto etanólico y acuoso (**Tabla N°10**). La determinación del % de citotoxicidad se realizó por comparación con los estadios normales de desarrollo observados en el control.

En base a los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad podemos observar que ambos extractos presentan una fuerte actividad citotóxica, pero el extracto acuoso

presenta una actividad citotóxica moderada en su concentración inferior; al observar los valores de actividad citotóxica se observa que el extracto acuoso a la concentración inferior muestra una actividad citotóxica inferior al extracto etanólico.

El extracto etanólico produjo blástulas anormales muertas y se observó una alta tasa de mortalidad en la concentración más baja mientras que en las más altas la letalidad fue del 100%.

Se observó al cabo de 24 horas, en el extracto acuoso se observó la formación de la fase gástrula y blástula en los embriones de erizos de mar que sobrevivieron, siendo similar esta formación al del grupo control.

Luego se observó que a las 48 horas algunos de los embriones llegaron a fase pluteus, lo que significaría que las concentraciones probadas no causaron un efecto directo a la célula pero si retardaron su desarrollo.

Asimismo, se observa que a la menor concentración aún se presenta una fuerte actividad citotóxica pero nada nos asegura que a una menor concentración aún se siga presentado este grado de actividad, por ello se recomendaría trabajar con concentraciones más bajas con la finalidad de encontrar la dosis mínima eficaz, para poder evaluar luego la posible actividad en células tumorales.

Los cromatogramas en papel descendente presentaron 6 bandas bien diferenciadas, la zona 5 mostró una marcada fluorescencia al ser expuesta a la lámpara UV de 254 nm. La revelación con vapores de amonio permitió observar una intensificación de la fluorescencia.

Para determinar la posible presencia de antraquinonas u otros metabolitos de importancia biológica, se realizó las reacciones de Shinoda y Bornträger a las 6 zonas reveladas (**Fig. N°26**), obteniéndose resultados positivos en las zonas 2, 3, 4 y 5 (**Tabla N°12**) lo que se evidenció a través de la coloración amarilla propia de las antraquinonas.

V. CONCLUSIONES

- 1 El bioensayo demostró que el extracto etanólico y acuoso del fruto de *Morinda citrifolia* (Noni) cultivado en el Perú tiene marcado efecto citotóxico a nivel de los embriones de erizo de mar.
- 2 El ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón ha revelado que el extracto etanólico y acuoso del fruto de *Morinda citrifolia* (Noni) cultivado en el Perú carece de genotoxicidad a nivel de los cromosomas.
- 3 El extracto etanólico y el extracto acuoso de *Morinda citrifolia* no modifican los niveles hematológicos, bioquímicos e histopatológicos al ser administrados durante 60 días por vía oral a ratas.
- 4 El análisis cromatográfico mostró que el extracto de *Morinda citrifolia* posee posibles compuestos que pertenecen al grupo de la antraquinonas.

VI. RECOMENDACIONES

Tras los resultados en las diferentes pruebas se recomienda lo siguiente:

- El ensayo de genotoxicidad de micronúcleos en sangre periférica de ratón debe ser completado con otros ensayos de genotoxicidad tales como: Fragmentación del ADN en espermatozoides. Test de Ames (para evaluar daño a nivel de los genes) y el ensayo de cometas (para evaluar daño a nivel del ADN).
- El bioensayo de citotoxicidad debe servir para demostrar una posible actividad antitumoral del extracto del fruto de *Morinda citrifolia*.
- En el ensayo de toxicidad a dosis repetidas debe ser incrementado el tiempo (estudio crónico) para evaluar el posible efecto del extracto del fruto *Morinda citrifolia* a períodos largos.
- Realizar un screening fitoquímico y determinar los componentes del fruto de *Morinda*.
- Difundir y ensayar los métodos brindados por la OECD

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nonato LD, Nina E, Cerruti T, Mestanza M, Gorriti A, Inchaustegui R. Evaluación tóxica, citotóxica y genotóxica de la corteza liofilizada de *Uncaria tomentosa* (Wild) DC. En: I Reunión Internacional del Género *Uncaria* “Uña de Gato”; 2001 Ago 16-18. Iquitos: Perú, 2001: 138-146.
2. Wall M, Wani M. Antimutagenic agents from natural products of terrestrial and marine origin. En: G Broenzetti et al. Antimutagenesis and carcinogenesis mechanisms. 3 Ed. New York: Plenum press, 1993: 87-97.
3. Ecobichon DJ. Mutagenesis. The basis of toxicity testing. Florida: MC Gill University, Montreal, 1993: 113-136.
4. OECD. Genetic Toxicology. Micronucleus test. En: Organización Económica de Cooperación y Desarrollo. Guidelines for the Testing of Chemicals. 1993: 475.<<http://www.oecd.org.html>> [Acceso: 15 Junio del 2008].
5. ICH. Genotoxicity: Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals. 1995: (4). <<http://www.ich.org.html>> [Acceso: 27 Setiembre del 2008].
6. OECD. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. En: Organization for Economic Cooperation & Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 1997: 474.
7. Popoca Silva J, Villarrel Ortega ML y Aguilar Contreras A. Actividad Citotóxica de extractos Orgánicos Derivados de Algunas Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana como Antitumorales. Thahui-Medic. 2000; 10(2): 84-85. En: Resumen de Ponencias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, Tlaxcala, Tlax. 1996 Jun 24-30.
8. Cragg GM, Boyd MR, Cardellina II JH, Newman DJ, Snader KM, McCloud TG. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. En: Chadwick DJ, Marsh J (Eds.). Ciba Foundation "Ethnobotany and the search for new drugs". UK: Wiley & Sons, Chichester .1994; 185: 178- 196.

9. Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villareal ML. Cytotoxic of selected plants used as antitumorals in Mexican tradicional medicine. Journal of Ethnopharmacology.1988; 59: 173-177.
10. Goodman, G. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. 9 Ed. México D.F.: Mc Graw - Hill-Interamericana, 1996;(1) y (2).
11. Mancebo A, Scull I, González Y, Arteaga M. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. Rev. Toxicol. 2002; 19: 73-78.
12. OECD. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. En: Organization for Economic Cooperation & Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris, 1995; 407.
13. Jhon H. Dufus, Manuel Repetto. Glosario de términos toxicológicos: IUPAC. Asociación Española de Toxicología. 1995
14. <http://www.paho.org/Spanish/PED/ProductosQuimicos/Quimicos/index_folder/word_html/4/4.html>. [Acceso: 30 de Mayo 2009].
15. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies. Drug Inf. J. 1994; 4.
16. International Conference on Harmonisation. Guideline on detection of toxicity to reproduction for medical products. Fed Reg. 1995; 59.
17. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity test for pharmaceuticals. Drug Inf. J. 1995; 4.
18. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Dose selection for carcinogenicity studies of pharmaceuticals. Drug Inf. J.1996; 4.
19. Garthoff B. Alternative testing in drug research and development. Validation issue. Toxicology *In Vitro*. 1995; 9: 789-793.
20. Ramirez D. Update in Pre-Clinical Regulatory Requirements for Phytomedicines in Latin America. Journal of Complementary and Integrative Medicine. 2005; 3(1).

21. Requisitos para las solicitudes de Inscripción, Renovación y Modificación en el Registro de Medicamentos de uso Humano. CECMED, Cuba. 2006.
22. Chabra RS, Bucher JR and Stokes WS. National Program strategies for use of alternative test systems. *Animal Alternative, Welfare and Ethics*. 1997; 1:607.
23. Zapatero Lorenzo J. Ética para el Uso de Animales de Laboratorio. En: X Congreso Latinoamericano de Toxicología. La Habana: Cuba, 1998.
24. Regulación 39/04. Principios de las Buenas prácticas de Laboratorio No Clínicos de seguridad sanitaria y medio ambiental. Publicación 00-35, CECMED, 2005. <<http://www.cecmed.sld.su/pages/AmbReg-4.htm>> [Acceso: 15 Mayo 2008].
25. Auletta CS. Acute Systemic Toxicity. En: Gad SC. *Product Safety Evaluation Handbook*. 2 ed. United States: Marcel Dekker. Inc, 1999: 43-86.
26. Putting C. Acute Oral Toxicity Testing Guidelines into Practice. Workshop organised by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), in partnership with the U.S. Environmental Protection Agency and the ILSI Risk Science Institute. Bethesda, Maryland. 2002; 19-21,
27. Chhabra RS, Huff JE, Schwetz BS and Selkirk J. A overview of precronic and cronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program, United States, 1990.
28. Piccirillo VJ. Repeated-Dose Toxicity Studies. En: Gad SC. *Product Safety Evaluation Handbook*. 2 ed. United States: Marcel Dekker. Inc. 1999: 201-222.
29. Bucher JP, Portier CJ, Goodman JI, Faustman EM and Lucier GW. Workshop overview: National Toxicology Program Studies: Principles of dose selection and applications to mechanism based risk assessment. *Fundamental Applied Toxicology*. 1996; 31:1-8.
30. Straughan D, Fentem J and Balls M. Replacement alternative and complementary in vitro methods in pharmaceutical research. En: Castell JV and Gómez-Lechón MJ. *In vitro methods in pharmaceutical research*. New York: Academic Press. 1997; 1(1): 1-15.

31. Arroyo J, Bonilla P, Ráez E, Suárez S, Palomino R, Terán S, et al. Compuestos fenólicos de la fracción metanólica de *Bidens pilosa*, sobre la neoplasia gástrica, inducida en ratas. An. Fac. Med. 2007; 68 (2): 105-112.
32. Anderson D. Genetic Toxicology. En: Anderson D. Experimental Toxicology. The basic issues in. 2 Edición. United States: Editorial England. 1993; 243-286.
33. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D and Blakey DH. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mut. Res. 1994; 293-312
34. Bonassi S., Fenech M., O. García, *et al.* Human Micronucleus Project: International Database. Comparison for Results with Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes. I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2001; 37: 31-45.
35. Roldán Elia y Pérez Anahí. Evaluación de micronúcleos en cultivo de linfocitos humanos tratados con *Casiopeina igly*. En: 2º Congreso Nacional de Química Médica. 2006
36. Mitchell AD. Genetic Toxicology Testing. En: Gad SC. Product Safety Evaluation Handbook. United States: Marcel Dekker, Inc. 1999; 167-200.
37. Tice RR, Agurell E and Anderson D. Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 2000; 35:206-222.
38. Collins AR, Dushinska M, Horváthova E and Munro E. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measure in vitro with the comet assay. Mutagenesis. 2001; 16: 297-305.
39. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. En: Chemical mutagens. New York: Hollaender Plenum. 1976.
40. Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Vanparys P, McGregor J. Micronucleus test: index of citogenetic damage. Past, present and future. Mut Res.1995; 344:103-108.
41. Udriou I. Pruebas citogenéticas aplicadas al control de alimentos de origen animal. Rev. Vet. 2007; 18(1): 62-64.

42. Hayashi M, Tice R, McGregor J, Romagna F, Pacchierotti F. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*.1994; 312:293-304.
43. Remigio Montero AC, Pérez Arnáez G, Fernández Esperón N, Bada Barro AM, Arteaga Pérez ME, Mancebo Rodríguez A. Estudio genotóxico in vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de la médula ósea de roedores. *Rev. Toxicol*. 2001; 18: 75-78.
44. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Proyecto X-1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. 1995, 226 p.
45. Hose JE. Potential uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. *Journal of Applied Toxicology*.1985; 5(4): 245-254.
46. Jacobs R, White S y Wilson L. Selective compound derived from marine organisms: effects on cell division in fertilized sea urchin eggs. *Federation Proceedings*. 1981; 40(1):28-31.
47. Wang My, Su C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Rev. Ann NY Acad Sci*. 2001; 952: 161-168.
48. Hiramatsu T, Imoto M, Koyan T, Umezawa K. Induction of normal phenotypes in ras-transformed cells by Damnacanthol from *Morinda Citrifolia*. *Cancer Letters*. 1993; 73:2-3,161-166.
49. Leistner E. Isolation, identification and biosynthesis of anthraquinones in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica Supplement*. 1975; 214-224.
50. Johnson A, Hemscheidt ST and Csiszar WK. Cytotoxicity of Water and Ethanol extracts of *Morinda citrifolia* (L.). Against Normal Epithelial and Breast Cancer Lines. *Proceedings, Hawaii. En: I Noni Conference*. 2002.
51. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de la palma real (*Roystonea regia*), mediante el Ensayo de Micronúcleos en Médula Ósea de Ratón. *Revista Cubana Farmacia*. 2009; 43(2):8-9.

52. Hirazumi A, Furusawa E. An Immunomodulatory polysaccharide-Rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with Antitumour Activity. *Phytother, Res.* 1999; 13:380-387.
53. Ruiz W, Boffill M, Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. *Rev Cubana Invest Biomed* 2005; 24(1):5-13.
54. Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits of *Morinda citrifolia*). The European Food Safety Authority (EFSA) Journal. 2006 Sep; 376:1-12.
55. Zea S, Medina A y Duque C. Ichthyotoxic, cytotoxic and antimicrobial activity of some sponges of the Colombian Caribbean. *An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín.* 1986; 5(16):31-48.
56. <<http://marenostrum.org/vidamarina/animalia/invertebrados/equinodermos/equinodermos.htm>> [Acceso: 28 Marzo 2010].
57. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br>> [Acceso: 30 Abril 2010].
58. <<http://www.stanford.edu/group/Urchin/contents.html>> [Acceso: 15 Mayo 2010].
59. Jorgelina Jiménez Miranda. Referencias bibliográficas según estilo Vancouver. 2001. La Habana; Cuba: Editorial Lázara Cruz. 2001:66-75.
60. Saf-ur Rehman Mandukhail. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. *Lipids in Health and Disease.* 2010; 9:88.
61. Westendorf, J., Effenberger, K., Iznaguen, H. and Basar, S. Toxicological and analytical investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2007; 55(2), 529-537.
62. Adrienne Nishioka and Pratibha Nerurkar. Effects of *Morinda citrifolia* (Noni) on Obesity and Glucose Tolerance in C57BL/6 Mice. *The FASEB Journal.* 2007; 21:781.14.